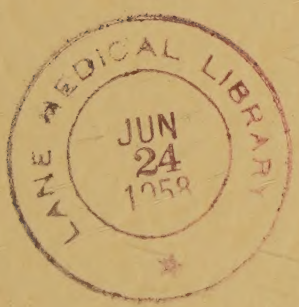
leiden
1957
Lane

ONDERZOEK NAAR DE RELATIE TUSSEN SCHILDKLIER, VITAMINE B_{12} EN DE MIGRATIE VAN GRANULOCYTEN IN VITRO



A. J. SAUER

ONDERZOEK NAAR RELATIE TUSSEN SCHILDKLIER, VITAMINE B_{12} EN DE MIGRATIE VAN GRANULOCYTEN IN VITRO

ONDERZOEK NAAR DE RELATIE TUSSEN SCHILDKLIER, VITAMINE B_{12} EN DE MIGRATIE VAN GRANULOCYTEN IN VITRO

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr. P. A. H. DE BOER, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 12 JULI 1957 TE 15 UUR

DOOR

ADRIAAN JOHANNES SAUER

GEBOREN TE KETHEL EN SPALAND
(THANS GEMEENTE SCHIEDAM)
IN 1919

DRUKKERIJ „LUCTOR ET EMERGO" — LEIDEN

Promotor: Prof. Dr. P. J. Gaillard

INHOUD

Hoofdstuk I. - Inleiding 1
Vitamine B_{12} 1
„Intrinsic factor" 5
Werking van het vitamine B_{12} 9
Mogelijk verband met de schildklierfunctie 10

Hoofdstuk II. - De werking van leverextract en vitamine B_{12} op beenmerg 15

Hoofdstuk III. - Probleemstelling 19

Hoofdstuk IV. - Methodiek 20
Materiaal 20
Uitvoering van de ijkingsproeven 23

Hoofdstuk V. - Onderzoek naar de werking van vitamine B_{12}-praeparaten 29
Onderzoek van leverextract 29
Onderzoek van vitamine B_{12}-praeparaten 30
Discussie 34
Conclusie 43

Hoofdstuk VI. - De invloed van de schildklier 45
Experimenten 45
Discussie 51
Conclusie 57

Samenvatting 59

Litteratuurlijst 61

HOOFDSTUK I

Inleiding

Vitamine B_{12}

Omtrent de aetiologie en de pathogenese van de pernicieuze anaemie zijn, sedert zij door Addison in 1855 en door Biermer in 1872 beschreven werd, verschillende theorieën naar voren gebracht.

Oorspronkelijk werd als oorzaak een inadaequate opname van het voedsel voorgesteld (Fenwick 1877). Later nam men een bacterieel agens aan: als gevolg van de achylia gastrica ontstaat een abnormale microflora in de darm (Hunter 1901, Moench 1925, Davidson 1928, Burkholder 1951b, Hoff-Jørgensen 1952); deze microben zouden toxinen produceren, een haemotoxine en een neurotoxine, die na resorptie resp. de haematologische en de neurologische verschijnselen der pernicieuze anaemie zouden veroorzaken (Hurst 1922).

Nadat Whipple c.s. (1925) in dierproeven hadden aangetoond dat het toedienen van lever- en spierweefsel het herstel van anaemie door bloedverlies bespoedigt, vonden Minot c.s. in 1926 het gunstige effect van een continue behandeling met lever. De hiervoor verantwoordelijke factor, het „anti-perniciosa-principe" (A.P.P.) genoemd, werd al heel spoedig sterk geconcentreerd in een uit lever bereid extract. De door Cohn (1928) bereide fractie G had in doses van 9 tot 14 gram per os een even grote anti-anaemische werking als 200 tot 400 gram rauwe lever. Later bleek dat deze fractie ook parenteraal kon worden toegediend en dan ca. 25 maal zo actief was als bij peroraal gebruik. De moeilijk vol te houden perorale behandeling met grote hoeveelheden lever per dag kon toen vervangen worden door intramusculaire injecties met grotere tussenpozen. Door voortdurende toediening van geconcentreerd leverextract is een blijvende remissie der ziekteverschijnselen te handhaven, behalve van reeds bestaande irreversibele neurologische afwijkingen, die onder deze therapie alleen in hun progressie gestuit worden (Flood c.s. 1950, Wilkinson c.s. 1949, Cameron c.s. 1951, Hyland c.s. 1951).

Met deze ontdekking was de grondslag gelegd voor de opvatting dat de pernicieuze anaemie een deficiëntieziekte is. Door Castle c.s. (1929a, 1929b, 1930, 1936) werd deze idee ontwikkeld en hun experimentele werk leidde tot de bekende hypothese dat het primaire defect bij de pernicieuze anaemie bestaat uit het onvermogen van het maagslijmvlies om „intrinsic factor" te produceren. Hierdoor kan het menselijk organisme de met het voedsel toegevoerde „extrinsic factor" niet benutten tot het verkrijgen van het A.P.P. Met andere woorden: de oorzaak der pernicieuze anaemie is een voorwaardelijke deficiëntie aan „extrinsic factor", waardoor het A.P.P. niet gevormd kan worden.

Nadat men er aanvankelijk spoedig in geslaagd was het A.P.P. te concentreren, heeft het ruim 20 jaar geduurd voordat het gelukte deze te isoleren. Een van de oorzaken van deze lange termijn is gelegen in het ontbreken van een eenvoudige testmethode voor het A.P.P. Van de vele biologische ijkingsmethoden die ontworpen zijn [1]) heeft geen enkele voldaan. Van de beste van deze methoden kan op zijn hoogst gezegd worden dat zij althans in de handen van enkelen bruikbaar zijn (de Jongh 1939). De isolering van het A.P.P. moest dus verricht worden aan de hand van de klinische resultaten die met de verkregen fracties werden bereikt. Hierbij bleken de stijging van het aantal reticulocyten en de daarop volgende stijging van het haemoglobinegehalte en het aantal erythrocyten tamelijk betrouwbare maatstaven te zijn. De individuele variatie in reactie is echter betrekkelijk groot en het aantal beschikbare onbehandelde lijders aan pernicieuze anaemie gering. De noodzaak van een klinische ijking moest dus wel een belangrijke vertraging van het isolatieproces ten gevolge hebben.

In 1947 vond Shorb dat de *Lactobacillus lactis* Dorner voor zijn groei o.a. een factor nodig heeft die aanwezig is in geconcentreerde leverpraeparaten. Toen Rickes c.s. (1948a) deze factor isoleerden, aan de hand van de daarop gebaseerde microbiologische test, bleek hij identiek te zijn met het A.P.P. (West 1948, Hall c.s. 1948). Dit laatste werd omstreeks dezelfde tijd geïsoleerd door Smith (1948a), die het anti-anaemische extract met behulp van de klinische ijking zover had gezuiverd dat de aanwezigheid van een rood gekleurde substantie zichtbaar was ge-

[1]) Een overzicht van deze methoden wordt gegeven door Girdwood (1950).

worden. Isolatie van deze rood gekleurde component bleek hier tot het gewenste einddoel te voeren.

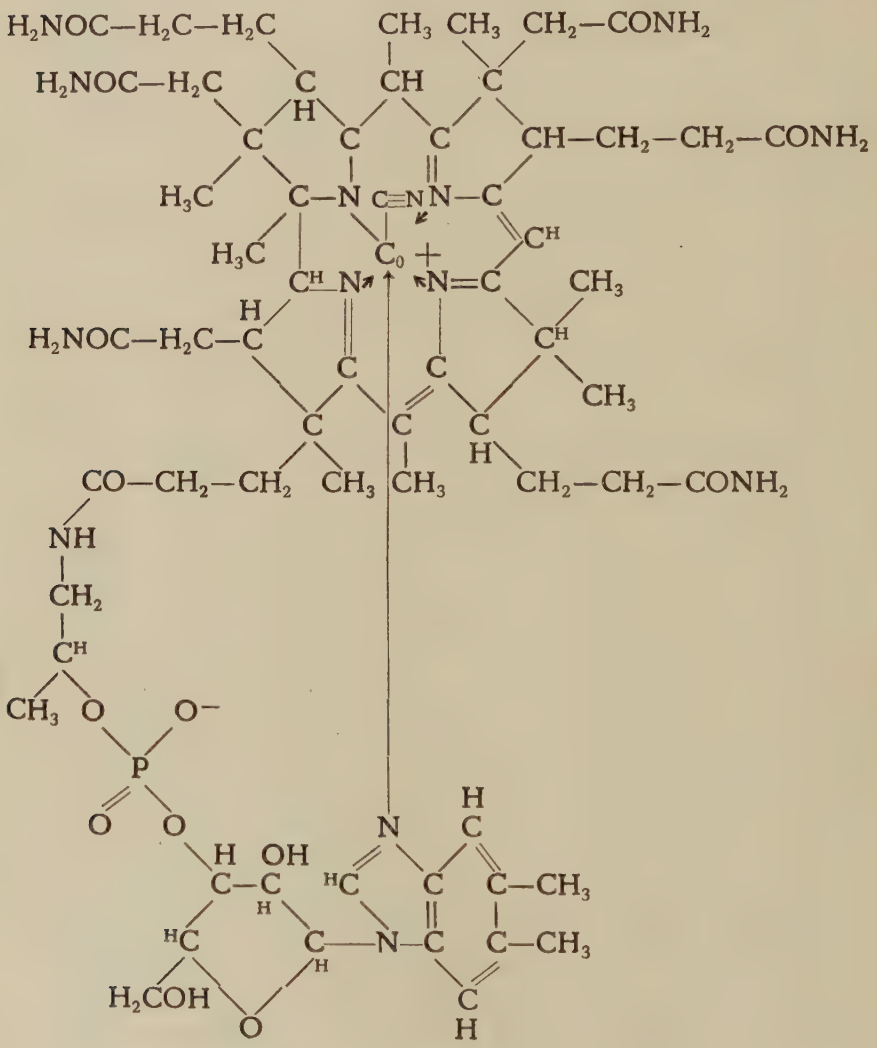
Dit in kristalvorm verkregen product werd door Rickes c.s. (1948a) vitamine B_{12} genoemd; het werd bij de vitaminen gerangschikt op grond van de uiterst geringe hoeveelheden waarin het biologisch actief bleek te zijn. Als onderhoudsdosering bij pernicieuze anaemie is ca. 1 γ per dag voldoende (Conley c.s. 1952).

Aanvankelijk bestond bij enkele auteurs twijfel of het zuivere vitamine B_{12} inderdaad de enige benodigde factor is bij de behandeling van de pernicieuze anaemie (Jacobson c.s. 1949, Meacham c.s. 1950). Uit de verslagen van Blackburn c.s. (1952), Conley c.s. (1952), Meacham c.s. (1953) en Cameron c.s. (1954) blijkt echter dat met parenterale toediening van zuiver vitamine B_{12} bij pernicieuze anaemie dezelfde resultaten worden bereikt als met de gebruikelijke levertherapie, zodat thans algemeen wordt aanvaard dat deze stof identiek is met het A.P.P. van Castle.

Ondertussen was gebleken dat het A.P.P. en de „extrinsic factor" zeer nauw verwant waren. Reeds in 1939 wees de Jongh erop dat de „intrinsic factor" een ferment zou kunnen zijn dat de resorptie van de „extrinsic factor" mogelijk maakt, waarna deze dan in de oorspronkelijke of een iets gewijzigde vorm in de lever kan worden opgeslagen. Gardner c.s. (1949), Morgan c.s. (1949) en Wolf c.s. (1950) bereidden uit skeletspier — een „extrinsic factor"-bron waaruit door incubatie met maagsap, afkomstig van normale mensen, het A.P.P. ontstaat — een extract dat parenteraal actief was bij patiënten met pernicieuze anaemie. Omgekeerd blijkt het vitamine B_{12}, dat per os alleen werkzaam is in doses die circa het honderdvoudige bedragen van de parenterale dosis (Ungley 1950a, 1950b, Chalmers c.s. 1954), bij perorale toediening wel in kleine hoeveelheden anti-anaemisch actief te zijn indien tegelijkertijd „intrinsic factor" wordt toegediend. (Berk c.s. 1948, Hall c.s. 1949, Ungley 1950a, Glass c.s. 1953, Wallerstein c.s. 1953). Thans worden algemeen het vitamine B_{12} en de „extrinsic factor" als identiek beschouwd.

Ook de opheldering van de structuur van het vitamine B_{12} heeft langer geduurd dan men tegenwoordig gewend is. Reeds tamelijk snel na de isolatie werd aangetoond dat het vitamine B_{12} per molecule 1 atoom kobalt bevat waaraan een cyaangroep is ge-

bonden, terwijl ook een 5,6-dimethylbenzimidazolgroep van het molecule kon worden afgesplitst. De structuur van het centrale deel van het vitamine B_{12}-molecule is echter pas sinds kort met vrij grote zekerheid bekend geworden als resultaat van de nauwe samenwerking van chemische en kristallographische onderzoekers in Engeland. Hodgkin c.s. (1955, 1956) en Bonnet c.s. (1955) menen dat het vitamine B_{12} de volgende structuurformule heeft:



In de natuur komen nog een aantal nauw met het vitamine B_{12} verwante stoffen voor die ervan afwijken doordat de cyaangroep gesubstitueerd is. Tezamen worden zij met de groepsnaam cobalaminen aangeduid. Zo vindt men naast het cyanocobalamine (vitamine B_{12}) het hydroxocobalamine (vitamine $B_{12}b$), nitritocobalamine, ammoniacobalamine, etc. Daarnaast komen de pseudovitaminen B_{12} voor, waarin de 5,6-dimethylbenzimidazolgroep is vervangen door adenylzuur (P f i f f n e r c.s. 1952).

Deze factoren tonen een verschillende activiteit zowel wat betreft hun anti-anaemische werkzaamheid als wat hun activiteit in de microbiologische toetsingen aangaat. Voor deze laatste worden als testorganismen tegenwoordig voornamelijk gebruikt de *Lactobacillus leichmannii* (S k e g g s c.s. 1948, H o f f m a n n c.s. 1948), de *Euglena gracilis* (H u t n e r c.s. 1949, R o s s 1950), een mutant van de *Escherichia coli* die vitamine B_{12} als groeifactor behoeft (D a v i s c.s. 1950, B u r k h o l d e r 1951[a]) en de *Ochromonas malhamensis* (H a m i l t o n c.s. 1952, G r e g o r y 1954).

Voor de behandeling van de pernicieuze anaemie komt van de groep der cobalaminen naast het vitamine B_{12} alleen nog het hydroxocobalamine in aanmerking, waarvan de activiteit slechts weinig geringer is dan van het cyanocobalamine zelf (L i c h t m a n c.s. 1949, S p i e s c.s. 1950, S c h i l l i n g c.s. 1951, M e y e r c.s. 1953).

„Intrinsic factor"

Het onderzoek naar de aard van het A.P.P. en van C a s t l e's „extrinsic factor" heeft dus geleid tot de conclusie dat deze beide identiek zijn, en de bouw van deze factor is vrijwel opgehelderd. Over de vraag hoe de voorwaardelijke deficiëntie aan deze factor ontstaat is echter nog geen definitief oordeel mogelijk.

Resorptie van vitamine B_{12} uit de tractus digestivus vindt slechts plaats wanneer er door de maag „intrinsic factor" wordt gesecerneerd. Dit is duidelijk aangetoond met behulp van peroraal toegediend radio-actief vitamine $B_{12}Co^{60}$ (C h a i e t c.s. 1950) of $B_{12}Co^{58}$ (B r a d l e y c.s. 1954, B a k e r c.s. 1955). Wanneer een patiënt lijdende aan pernicieuze anaemie hoeveelheden van 0,5 tot 1 γ radio-actief vitamine B_{12} per os ontvangt, wordt 70 - 100% van de radio-activiteit in de faeces teruggevonden, d.w.z. dat er

0 - 30% wordt geresorbeerd. Bij normale individuen wordt in deze proefopstelling slechts 15 - 40% van de toegediende radio-activiteit met de faeces verwijderd. Door aan het vitamine B_{12} „intrinsic factor" toe te voegen bereikt men ook bij pernicieuze-anaemiepatiënten normale waarden voor de faecale excretie (Heinle c.s. 1952, Welch c.s. 1952, Meyer 1953, Callender c.s. 1954).

Het blijkt dus dat bij pernicieuze anaemie vaak wel enige resorptie optreedt. Conley c.s. (1953) konden dan ook door het peroraal toedienen van 1 mg vitamine B_{12} per week bij ruim 100 patiënten, waarvan er 15 ten tijde van de publicatie reeds $2\frac{1}{2}$ jaar onder contrôle waren, een remissie teweeg brengen.

Het onderzoek met radio-actief vitamine B_{12} is niet alleen van belang voor het vaststellen van de „intrinsic factor"-activiteit van maagpraeparaten, doch het is tevens een belangrijk hulpmiddel bij de diagnostiek der pernicieuze anaemie. Onafhankelijk van een reeds toegepaste therapie is op deze wijze te bepalen of de betrokken patiënt „intrinsic factor" secerneert; de afwezigheid van deze factor is immers de primaire stoornis bij deze ziekte.

Een eenvoudiger methode van onderzoek werd aangegeven door Schilling (1953); wanneer men 1 - 2 γ radio-actief vitamine B_{12} peroraal toedient aan normale individuen, gevolgd door een „flush out" dosis van 1000 γ normaal vitamine B_{12} intramusculair, dan vindt men in de urine van de eerstvolgende 24 uur 7 - 22% van de toegediende radio-activiteit terug. Patiënten, die lijden aan pernicieuze anaemie, of die een totale maagresectie hebben ondergaan, scheiden in deze periode slechts 0 - 2,3% van de orale dosis in de urine uit, tenzij men „intrinsic factor" aan de orale gift toevoegt, waardoor weer normale waarden worden bereikt. (Schilling, 1955). Hoewel Callender c.s. (1955), die een kleinere proefdosis toedienden, over de gehele linie hogere waarden vonden, zagen ook zij duidelijke verschillen tussen de resorptie bij normalen en bij pernicieuze-anaemiepatiënten. Vanzelfsprekend is het eenvoudiger alle urine van 24 uur op te vangen dan de faeces te verzamelen tot op het moment dat deze geen radio-activiteit van enige betekenis meer bevat.

Een verdere vereenvoudiging is beproefd door Glass c.s. (1954, 1955) door 6 - 10 dagen na de perorale toediening van 0,5 - 1 γ radio-actief vitamine B_{12} de radio-activiteit boven de lever

te meten. Hiermede verkregen zij tot dusverre bevredigende resultaten.

Waar dus het resultaat van de „intrinsic factor"-werking duidelijk is, kan de wijze waarop deze wordt gerealiseerd nog slechts tot speculaties aanleiding geven.

Toen in 1949 Ternberg c.s. aantoonden dat in normaal maagsap een factor (apoerytheine) aanwezig is, die met vitamine B_{12} een complex vormt dat microbiologisch inactief is — d.w.z. dat de microörganismen die het vitamine B_{12} als groeifactor behoeven, het in deze vorm niet kunnen benutten — leek hier een aangrijpingspunt van de werking van de „intrinsic factor" gevonden te zijn. Het apoerytheine was, evenals deze laatste, thermolabiel en bleek bij pernicieuze-anaemiepatiënten in veel geringere mate aanwezig te zijn dan bij normalen.

Dit gegeven zou kunnen passen in de hypothese, dat bij pernicieuze anaemie de vitamine B_{12}-deficiëntie ontstaat doordat zich in het proximale deel van de darm, als gevolg der anaciditeit, een microflora nestelt, die het met het voedsel toegevoerde en nu niet door complexvorming beschermde vitamine B_{12} verbruikt. Inderdaad vond Hoff-Jørgensen (1952), evenals Burkholder (1951b, 1952), dat de *Escherichia coli* („wild type") die bij pernicieuze anaemie in grote hoeveelheden in de maag en in het proximale deel van de darm wordt aangetroffen (Hausmann c.s. 1954) zeer veel vitamine B_{12} uit het milieu kan opnemen; varkensmaagextract en maagsap van normale mensen zijn in staat deze opname te verhinderen.

Wanneer echter dit mechanisme de enige oorzaak der vitamine B_{12}-deficiëntie bij pernicieuze anaemie zou zijn, dan zou een darmsterilisatie door middel van antibiotica een afdoende therapeutische maatregel moeten vormen.

Inderdaad verkregen Lichtman c.s. (1950), door aan 4 patiënten met pernicieuze anaemie peroraal chlortetracycline toe te dienen, bij allen enige haematologische verbetering, die echter geringer was dan met een adaequate vitamine B_{12}-therapie kan worden bereikt. Vermindering van de bacteriële darmflora met behulp van oxytetracycline gaf geen verhoging van de opname van vitamine B_{12} (Schilling 1953). Ook Ungley (1950a) vond met de erythropoiesis als index geen aanwijzingen dat darmbacteriën

de vitamine B_{12}-resorptie zouden verhinderen. Bovendien is het moeilijk in te zien hoe de microflora in competitie met het darmepitheel ook van een overvloedige vitamine B_{12}-toevoer vrijwel 100% zou kunnen verbruiken.

Anderzijds kan men zich voorstellen dat het vitamine B_{12} zeer slecht resorbeerbaar is, tenzij het met „intrinsic factor" tot een complex is gekoppeld. Hierbij zou een physicochemische verandering een rol kunnen spelen; zo wordt b.v. het chlorocobalamine veel slechter geresorbeerd dan het cyanocobalamine zelf (Rosenblum c.s. 1955), mogelijk ten gevolge van de sterke dissociatie van het eerste.

Uit de experimenten van Nieweg c.s. (1956) is evenwel gebleken dat de werking van de „intrinsic factor" soort-specifiek kan zijn. Bij ratten, waarvan de maag verwijderd was, werd peroraal toegediend radio-actief vitamine B_{12} niet geresorbeerd. Door het toevoegen van rattenmaagsap werd de resorptie normaal, terwijl daarentegen maagsap van mensen en varkensmaag-praeparaten de opname van het vitamine niet bevorderden. Deze bevindingen wijzen erop dat er een relatie tussen de darmwand en de „intrinsic factor" tot stand moet komen, wil het vitamine B_{12} geresorbeerd worden. De waarnemingen dat de behandeling van de pernicieuze anaemie met de combinatie van lever en varkensmaag op den duur niet geheel bevredigende resultaten geeft (Blackburn c.s. 1955), zou op ditzelfde verschijnsel kunnen berusten.

Het belang van de vorming van het vitamine B_{12}-„intrinsic factor"-complex is evenwel dubieus geworden, doordat gebleken is dat het vermogen van maagpraeparaten om de resorptie van vitamine B_{12} te bevorderen gescheiden kan worden van het vitamine B_{12}-bindingsvermogen. Hoewel Bethell c.s. (1951) bij het onderzoek van de verschillende „intrinsic factor"-praeparaten vonden dat deze beide eigenschappen gecorreleerd waren, kon Spray (1952) door matige verhitting (20 minuten bij 95° C) de „intrinsic factor"-activiteit vernietigen, zonder dat hierdoor het vitamine B_{12}-bindingsvermogen werd beïnvloed. Bij het fractionneren van maagpraeparaten vonden Latner c.s. (1953), Prusoff c.s. (1953), Everse c.s. (1954) en Wijmenga c.s. (1954) een divergentie van beide eigenschappen. Desondanks komen er de laatste jaren nog steeds aanwijzingen dat complexvorming van vitamine B_{12} bij de werking een rol speelt. Haus-

mann c.s. (1952) vonden in zoogdierlevers het vitamine B_{12} voornamelijk in polypeptide-conjugaten. In het serum komt vitamine B_{12} vrijwel uitsluitend in een gebonden, microbiologisch inactieve, vorm voor, waaruit het door verhitting kan worden vrijgemaakt (Ross 1952, Pitney c.s. 1954, Mollin c.s. 1955, Wilson c.s. 1955). Bij electrophorese van serum vonden Pitney c.s. (1954) het vitamine B_{12}-complex in de α-globulinen, terwijl in leverextract de β-globulinefractie een microbiologisch actief vitamine B_{12}-complex bevatte; Andresen (1954) isoleerde uit een met vitamine B_{12} geïncubeerd maagpraeparaat een vitamine B_{12}-eiwit-complex dat homogeen leek en zowel microbiologisch als klinisch-haematologisch actief bleek te zijn.

Werking van het vitamine B_{12}

Een tweede probleem waarvoor de pernicieuze anaemie ons nog stelt, betreft de wijze waarop bij een tekort aan vitamine B_{12} een megaloblastaire anaemie en eventueel neurologische afwijkingen ontstaan.

Sinds gebleken is dat vitamine B_{12} nodig is voor de optimale groei van varkens (Hogan c.s. 1949), ratten (Frost c.s. 1949), muizen (Jaffé, 1950) en kuikens (Ott c.s. 1948) kreeg de vraag naar de functie van het vitamine B_{12} bij het celmetabolisme een algemener belang. Het verband tussen het „anti-perniciosa-principe" en de „Animal Protein Factor" is echter pas gelegd nadat het vitamine B_{12} in krístalvorm was verkregen. Opmerkenswaardig is hierbij nog dat men sindsdien wel beschikt over een ijkingsmethode met behulp van laboratoriumdieren, b.v. ratten of kuikens. Hierbij moet evenwel het criterium niet in het bloed- of beenmergbeeld worden gezocht, doch in de groeicurve.

Het vraagstuk wordt nog gecompliceerd doordat het pteroylglutaminezuur (folinezuur) en daarmee verwante substanties zoals het leucovorin (citrovorum factor) bij de pernicieuze anaemie wel de erythropoiese op normale wijze doen verlopen (Spies 1946, Girdwood 1951), doch geen of een ongunstige invloed hebben op het ontstaan of het toenemen van neurologische ziekteverschijnselen (Ross 1948, Israëls c.s. 1949).

Ook een deficiëntie aan folinezuur leidt tot een megaloblastaire anaemie, die men ziet in sommige gevallen van tropische spruw

en van zwangerschapsanaemie en die dan niet met vitamine B_{12}-therapie te genezen is. (Bethell c.s. 1948, Ungley 1952). Badenoch c.s. (1955) vonden bij dergelijke patiënten een normale resorptie van vitamine B_{12} uit het darmkanaal.

Op de belangwekkende biochemische experimenten, waaruit blijkt dat zowel vitamine B_{12} als folinezuur betrokken is bij de nucleinezuursynthese kan hier niet worden ingegaan. Uitgebreide overzichten zijn gegeven door Welch c.s. (1951), Girdwood (1952), Nieweg (1953), Mueller c.s. (1955), Williams (1955) e.a.

Mogelijk verband met de schildklierfunctie

In de litteratuur wordt herhaaldelijk verband gelegd tussen functiestoornissen van de glandula thyreoidea en het bestaan van pernicieuze anaemie. Uit klinische overzichten blijkt dat diverse auteurs de frequentie van de combinatie van deze beide aandoeningen opvallend groot vinden. Meulengracht (1929) vond bij 151 patiënten, lijdende aan de morbus Basedow, 7 maal een pernicieuze anaemie. Wilkinson (1949) vond dat van de 1600 pernicieuze-anaemiepatiënten uit zijn materiaal er 42 tevens een schildklieraandoening hadden, te weten: 33 gevallen van morbus Basedow, 7 gevallen van myxoedeem en 2 gevallen van struma nodosa. Slechts in 5 van deze gevallen ging de anaemie aan de schildklierafwijking vooraf. Bán (1954) trof onder 141 patiënten met pernicieuze anaemie 3 gevallen van hyperthyreoidie en 1 myxoedeem aan.

De meest frequent voorkomende combinatie is dus die met hyperthyreoidie. Hierbij zou mogelijk een rol kunnen spelen de achylia gastrica die bij deze toestand zeer vaak bestaat; in sommige onderzochte series werd zij zelfs in 80% der gevallen aangetroffen (Oliver c.s. 1933). Inderdaad is gebleken dat de secretie van „intrinsic factor" slechts dan geheel of bijna geheel ontbreekt, wanneer er tevens een achylia gastrica bestaat. Schilling (1955) vond evenwel bij individuen met achylie, die geen verschijnselen van pernicieuze anaemie vertoonden, in de meeste gevallen een normale resorptie van vitamine B_{12} uit de tractus digestivus, waaruit blijkt dat zij voldoende „intrinsic factor" secerneerden. Mulder c.s. (1947) beschreven 2 patiënten met

een combinatie van hyperthyreoidie en pernicieuze anaemie, waarbij deze laatste blijvend genas na subtotale thyreoidectomie. De bij beide patiënten bestaande achylia gastrica bleef daarbij onveranderd aanwezig. Bij patiënten met pernicieuze anaemie lijkt het onvermogen om „intrinsic factor" te produceren irreversibel te zijn; zij hebben een continue therapie nodig en bij een therapeutische remissie wordt nooit een meer dan minimale „intrinsic factor"-activiteit in het maagsap aangetroffen. Het lijkt dus niet waarschijnlijk dat in de gevallen, waarin hyperthyreoidie en pernicieuze anaemie tezamen worden aangetroffen, een atrophie van het maagslijmvlies met sterk belemmerde of afwezige secretie van „intrinsic factor" altijd de oorzaak van de vitamine B_{12}-deficiëntie is.

Meer aannemelijk is de hypothese dat men bij hyperthyreoidie te maken heeft met een toegenomen behoefte aan vitamine B_{12}. Uit vele experimenten met ratten, die hyperthyreotisch worden gemaakt door aan de voeding thyreoidpoeder, thyroxine of gejodeerd caseïne toe te voegen, is gebleken dat onder deze omstandigheden, naast andere deficiënties, een tekort aan vitamine B_{12} ontstaat. (Nichol c.s. 1949, Emerson 1949, Betheil c.s. 1948, Bolene c.s. 1950, Sure c.s. 1950, Prinzie 1951, Rupp c.s. 1951). Vermoedelijk is er in dit geval ten gevolge van de hyperthyreoidie een sterk verhoogde behoefte aan dit vitamine, waardoor de normale toevoer met het voedsel onvoldoende wordt. Bij het opheffen van de verschijnselen met vitamine B_{12} is de perorale toedieningswijze even effectief als de subcutane (Emerson 1949), waaruit blijkt dat de deficiëntie niet het gevolg is van een resorptiestoornis. Deze opvatting vindt steun in de bevinding van Rabbi c.s. (1954) dat het gehalte aan vitamine B_{12} van de lever bij hyperthyreoide ratten groter is dan bij normale contrôledieren. Fatterpaker c.s. (1955) stelden dan ook de mogelijkheid dat de primaire manifestatie van thyreotoxicose een vitamine B_{12}-deficiëntie is, waardoor de vorming en het gebruik van energierijke bindingen worden verstoord. Het is dan mogelijk dat ook bij een normale, of hoogstens matig geremde, „intrinsic factor"-productie een relatieve vitamine B_{12}-deficiëntie optreedt, die verdwijnt bij het opheffen van de toestand van verhoogde behoefte.

Voor het verklaren van de combinatie van pernicieuze anaemie

met hypothyreoidie komt een dergelijke relatieve vitamine B_{12}-deficiëntie niet in aanmerking. De afname van de haematopoiese bij myxoedeem is, vanuit een teleologische gedachtengang bezien, een begrijpelijk verschijnsel, daar onder deze omstandigheden een verlaagd metabolisme met een geringere zuurstofbehoefte bestaat. Het is ook reeds lang bekend dat na thyreoidectomie bij dieren een daling van het aantal erythrocyten en van het haemoglobinegehalte van het bloed optreedt (Dominicis 1895, Sharpe c.s. 1936). Axelrod c.s. (1950) vonden dan ook bij patiënten met hypothyreoidie een hypoplasie van het haematopoietische beenmerg. Dit zou de tegenhanger kunnen zijn van de polycythaemie die ontstaat bij verminderde zuurstoftoevoer in euthyreoide individuen. Reeds lang is bekend dat een verblijf in een atmosfeer met verlaagde zuurstofspanning een vermeerderde erythropoiese veroorzaakt (Bert 1882, Viault 1890). Nadat door Carnot c.s. (1906) in het plasma van dieren, die door bloedafname anaemisch waren gemaakt, een factor was aangetoond die de erythropoiese stimuleert, vond Müller (1912) een dergelijke activiteit in het plasma van dieren, die in een atmosfeer met verminderde zuurstofspanning waren gebracht. Sindsdien hebben talrijke onderzoekers zich bezig gehouden met deze humorale regulering der erythrocyten-productie. Erslev c.s. vonden dat plasma van anaemisch gemaakte konijnen (Erslev 1953a) en apen (Erslev c.s. 1953b) een duidelijke reticulocytosis veroorzaakte, wanneer het in tamelijk grote hoeveelheden in dieren van dezelfde soort werd geïnfundeerd. Het beenmerg, dat alleen bij konijnen onderzocht werd, gaf een stijging van het aantal normoblasten te zien. Reismann (1950) had ook bij parabiotische ratten het stimuleren van de erythropoiese door het bloed na hypoxie kunnen aantonen. Ook bij de mens is deze activiteit in het plasma aangetoond bij verschillende toestanden, zoals bij chronische hartziekte (Bonsdorff c.s. 1948), na bloeding (Oliva c.s. 1949), bij erythroblastosis foetalis (Seip 1955), bij regionale anoxie (Stohlman c.s. 1954, Schmid c.s. 1955), en bij thalassaemie (Piliero c.s. 1956).

Diverse onderzoekers (Borsook c.s. 1954, Gordon c.s. 1954, Tohá c.s. 1955, Linman c.s. 1956) hebben deze „erythropoietic stimulating factor" uit het bloed van anaemisch gemaakte konijnen en ratten geëxtraheerd en tenslotte een vermoe-

delijk eiwit-vrij product verkregen dat het herstel van een verbloedingsanaemie bespoedigt, een reticulocyten-reactie opwekt en bij normale dieren na herhaalde toediening een polycythaemie veroorzaakt met hyperplastisch beenmerg.

Over de aard van deze factor is nog geen nader inzicht verkregen. Mansfeld (1938) was van mening dat de humorale stimulering van het erythropoietische apparaat plaats vindt door tussenkomst van de glandula thyreoidea. Zowel de productie van als de reactie op de erythropoiese-stimulerende factor zou uitblijven bij schildklierloze dieren. Een verblijf gedurende 3 weken op een hoogte van 1500 m boven de zeespiegel gaf bij normale konijnen een duidelijke toename van het aantal erythrocyten, die niet optrad bij schildklierloze dieren. Het herstel van de anaemie die ten gevolge van phenylhydrazine toediening bij konijnen optreedt, werd sterk vertraagd door bij deze dieren de schildklier te exstirperen. Bovendien vond Mansfeld een verband tussen de schildklierfunctie en de werking van leverextract. Wanneer konijnen ingespoten werden met saponine en collargol ontstond een anaemie, die gedurende vele weken tamelijk constant bleef (Gottlebe 1936). De zo behandelde dieren reageerden op injecties van anti-anaemische leverpraeparaten met een toename van het aantal erythrocyten, die recht evenredig was met de toegediende dosis. Deze reactie op leverextracten nu bleef uit wanneer bij de proefdieren bovendien de schildklier was verwijderd. Toediening van een totaalextract van konijnenschildklier was in staat de erythropoietische activiteit van het leverpraeparaat te herstellen; thyroxine was in dit opzicht onwerkzaam. Merkwaardig was bij dit alles nog dat bij de schildklierloze proefdieren anti-anaemische maagpraeparaten wel volledig werkzaam gevonden werden (Mansfeld c.s. 1938). Mansfeld (1943) scheidde uit het totaalextract een fractie af, die bij schildklierloze, met saponine en collargol anaemisch gemaakte, konijnen de schildklierfunctie in deze proefopstelling kon vervangen, doch die hoegenaamd geen effect had op het basaalmetabolisme. Hij gaf aan de actieve factor uit deze fractie de naam „myelotroop hormoon".

Het bestaan van een afzonderlijk „myelotroop hormoon" is niet van andere zijde bevestigd. Volgens een mededeling van Takacs c.s. (1951) wordt door het toedienen van methylthiouracil ook de vorming van het „myelotroop hormoon" geremd.

Hoewel over het mogelijke verband tussen de schildklierfunctie en de werking van het vitamine B_{12}, behalve door Mansfeld, zeer weinig is gepubliceerd, zijn er enkele aanwijzingen in de litteratuur, die een verder onderzoek kunnen stimuleren. De anaemie die Axelrod c.s. (1950a, b) bij patiënten, lijdende aan hypothyreoidie vonden, was duidelijk macrocytair. Kunde c.s. (1931) zagen een sterk hyperchrome anaemie optreden wanneer zij bij zeer jonge konijnen de schildklier verwijderden. Experimenten in vitro hebben eveneens een aanduiding gegeven voor het bestaan van een verband tussen de activiteit van anti-anaemisch leverextract en de schildklierfunctie, zoals in het volgende hoofdstuk zal worden vermeld.

HOOFDSTUK II

De werking van leverextract en vitamine B_{12} op beenmerg

De vraag of het vitamine B_{12} en dus ook anti-anaemische leverextracten direct op de erythropoiese aangrijpen heeft geleid tot experimenten met cultures van beenmerg.

Osgood c.s. (1937) die een suspensie van beenmerg van pernicieuze-anaemiepatiënten kweekten in een vloeibaar medium, zagen bij toevoegen van leverextract een vermeerdering van de celgroei. Astaldi c.s. (1948) en Rusznyak c.s. (1947) vonden met gebruikmaking van een analoge methodiek dat leverextract een rijping van megaloblasten teweeg brengt. Lajtha (1950) vermeldde dat leverextract en folinezuur beide in staat zijn megaloblasten in vitro te doen rijpen, vitamine B_{12} echter niet. Perri c.s. (1951) vonden eveneens leverextract en folinezuur actief. Franco c.s. (1951) en Thompson (1952) bevestigden dit voor zover het de activiteit van folinezuur en de onwerkzaamheid van vitamine B_{12} betreft. Deze laatste onderzoeker vond echter geen rijping door toevoeging van leverextract. en veronderstelde dat het effect dat anderen daarmee verkregen hadden, berustte op de aanwezigheid van folinezuur of citrovorum factor in het leverextract, dat zij in veel grotere hoeveelheden hadden toegevoegd dan hijzelf.

Daarnaast meenden Rusznyak c.s. (1947) en Lajtha (1950, 1952) in het serum van patiënten met pernicieuze anaemie een rijpingsremmende factor te kunnen aantonen, wat door Thompson (1952) en Feinmann (1952) niet kon worden bevestigd.

Deze laatste vestigde op grond van de analyse van zijn resultaten de aandacht op de hoge eisen die gesteld moeten worden aan de uitvoering van de experimenten om met de cultuur in suspensie betrouwbare gegevens te verkrijgen. Reisner c.s. (1953) delen deze mening; ook zij verkregen met de suspensiemethode wisselende uitkomsten.

Terwijl dus deze weefselcultuurproeven erop zouden kunnen wijzen dat het vitamine B_{12} niet als zodanig direct aangrijpt op de rijping van megaloblasten, kwamen Horrigan c.s. (1950, 1952) op grond van experimenten in vivo tot een tegenovergesteld resultaat. Zij instilleerden vitamine B_{12} of folinezuur in het beenmerg van de crista iliaca van pernicieuze-anaemiepatiënten en onderzochten na 48 uur beenmerg-aspiraties uit de punctieplaats en uit de contralaterale crista iliaca. Instillatie van vitamine B_{12} (in een dosis, waarop het overige deel van het haematopoietische systeem niet reageerde) veroorzaakte een normoblastair worden van het beenmerg bij de injectieplaats; folinezuur daarentegen had geen effect. De mogelijkheid bestaat dat het vitamine B_{12} bij deze proeven ter plaatse in een actieve vorm is omgezet. Uit andere weefselcultuurproeven is evenwel gebleken dat ook in vitro een effect van het toevoegen van vitamine B_{12} kan worden gezien. Reisner c.s. (1953) en Swan c.s. (1955) kweekten beenmergfragmenten op een plasmacoagulum met een vloeibare phase erboven. Wanneer dit laatste bestond uit verdund serum van een onbehandelde patiënt met pernicieuze anaemie trad weinig celgroei op, die sterk werd gestimuleerd bij toevoeging van vitamine B_{12}.

In 1938 werd door Overbeek, Gaillard en de Jongh de werking van geconcentreerde leverpraeparaten op beenmergweefsel in vitro onderzocht (Overbeek c.s. 1938). Hierbij bleek dat stukjes caviabeenmerg die gekweekt werden in een gecoaguleerd plasmamedium reeds binnen korte tijd omringd waren door een zône waarin zich talrijke losse cellen bevonden, voornamelijk granulocyten, die uit het explantaat waren gemigreerd. De migratiezône had na een incubatieduur van 12 tot 24 uur een oppervlakte die tientallen malen groter was dan de oppervlakte van het explantaat. Wanneer aan het medium een anti-anaemisch leverpraeparaat in verschillende concentraties werd toegevoegd, dan bleek dat een geconcentreerd handelspraeparaat in verdunningen van 1 op 80 en van omstreeks 1 op 100.000 de migratie duidelijk versterkte. Genoemde auteurs ontwikkelden een quantitatieve ijkingsmethode voor leverpraeparaten, berustend op het migratiebevorderend effect dat anti-anaemische praeparaten in een reeks verschillende verdunningen op explantaten van cavia-

beenmerg uitoefenen. Gaillard c.s. (1940) toonden aan dat producten die geen anti-anaemische activiteit bezitten ook deze migratiebevorderende werking missen; zij onderzochten hiertoe leverextract bereid uit vislevers en een mengsel van bekende, in lever voorkomende, niet anti-anaemisch werkzame substanties. Praeparaten vervaardigd uit het incubatieproduct van paardenvlees met maagsap van normale mensen bleken daarentegen dezelfde migratiebevorderende werking uit te oefenen als anti-anaemisch leverextract. Verhitting of zure hydrolyse van leverextract leidde tot een verminderde werkzaamheid in deze ijkingsmethode, die overeen bleek te komen met de verandering van de anti-anaemische activiteit. De migratie van bindweefselcultures van andere oorsprong, n.l. van osteogenetische cellen en van hartfibroblasten, werd niet gestimuleerd door anti-anaemisch leverextract.

Pace c.s. (1942) pasten deze methode toe, gebruikmakend van de migratiebevordering bij hogere verdunningen, en vonden eveneens een quantitatieve correlatie tussen de optimale verdunning van het anti-anaemische praeparaat en de klinische werkzaamheid. Young c.s. (1944) konden deze relatie niet bevestigen. Armbrust c.s. (1946) beschreven een modificatie van deze techniek, waarmee zij een qualitatieve ijking van anti-anaemische leverextracten konden uitvoeren; in 1949 vermeldden deze auteurs echter dat de activiteit in vitro bij fractionnering van een actief leverextract gescheiden kon worden van de klinische werkzaamheid. Deze onderzoekers baseerden hun concentratie-migratiecurve evenwel op een onderzoek bij slechts 2 verdunningen van het leverpraeparaat en een contrôle zonder dit praeparaat, zodat het begrijpelijk is dat hun resultaten niet overeen stemmen met de bevindingen van Overbeek c.s.

Naar aanleiding van de in het eerste hoofdstuk vermelde bevindingen van Mänsfeld (1938, 1943) bij schildklierloze konijnen met een experimentele anaemie, hebben Gaillard c.s. zich de vraag gesteld of de schildklier ook de uitkomsten van hun ijkingen zou beïnvloeden. Zij verwijderden de schildklier bij de caviae waarvan het beenmerg, en bij die waarvan het bloedplasma werd gebruikt, en vonden dat onder deze omstandigheden de migratiebevorderende werking van leverextract uitbleef (Gaillard c.s. 1940, Overbeek c.s. 1942). Zij kregen de indruk

dat het hiertoe reeds voldoende was als hetzij het beenmerg, hetzij het plasma afkomstig was van een schildklierloos proefdier.

In 1941 moesten deze auteurs evenwel hun experimenten op dit gebied onderbreken omdat een nog onopgehelderde oorzaak het caviabeenmerg onbruikbaar maakte voor hun proeven. Alle proefdieren bleven achter in groei, de beenderen bleven zeer fragiel en het haematopoietische beenmerg toonde een sterke vervetting.

Na het einde van de tweede wereldoorlog bleek deze ijkingsmethode weer dezelfde resultaten op te leveren als voor 1941. Sindsdien was dus de mogelijkheid gegeven de afgebroken proefnemingen te hervatten.

HOOFDSTUK III

Probleemstelling

De bedoeling van ons onderzoek is in eerste aanleg de proeven van Gaillard en medewerkers te hervatten op het punt, waar zij in 1941 moesten worden afgebroken.

Het gestelde probleem kan dan als volgt worden omschreven: Treedt de migratiebevorderende werking, die anti-anaemische leverextracten uitoefenen op explantaten van caviabeenmerg ook op wanneer de glandula thyreoidea is verwijderd bij het proefdier, waarvan het beenmerg wordt geëxplanteerd en/of het proefdier, waarvan het bloedplasma voor het medium wordt gebruikt. Indien deze migratiebevordering uitblijft, is dan de aanwezigheid van de functionnerende glandula thyreoidea te substitueren door het toevoegen van schildklier-explantaten.

Tijdens onze voorbereidende proefnemingen werd, zoals eerder beschreven werd (pag. 2) door Rickes en door Smith het vitamine B_{12} geïsoleerd en als het werkzame bestanddeel van anti-anaemische leverpraeparaten geïdentificeerd. Tot op dat moment bestond er geen zekerheid of het migratiebevorderend effect in deze proefopstelling inderdaad werd veroorzaakt door het „anti perniciosa principe", of door een andere factor, die bij de concentratie van de anti-anaemische praeparaten telkens in dezelfde fractie als verontreiniging aanwezig was gebleven. Het was dus van belang na te gaan of ook het zuivere vitamine B_{12} deze migratiebevorderende activiteit toonde. Indien dit het geval was, hadden wij bovendien het voordeel onze proeven met een standaardoplossing van een zuivere, kristallijne substantie te kunnen uitvoeren. Wij hebben dan ook het eerste deel van ons onderzoek gewijd aan de tweede probleemstelling, die luidt:

Heeft het vitamine B_{12} een migratiebevorderend effect op explantaten van caviabeenmerg, en indien dit het geval is, berust de migratiebevorderende werking van leverextracten dan uitsluitend op het vitamine B_{12}-gehalte hiervan.

HOOFDSTUK IV

Methodiek

De proefopstelling berust, behoudens enkele wijzigingen van ondergeschikt belang, op de methode zoals die door Gaillard c.s. (1940) werd toegepast. Aan de beschrijving hiervan zullen wij een bespreking van het toegepaste materiaal doen voorafgaan.

Materiaal

Beenmerg

Hiervoor werd het haematopoietische beenmerg uit de femora van jonge caviae genomen. Het femur werd als bron gekozen, omdat het merg hieruit gemakkelijk als één geheel verwijderd en vervolgens in stukjes van de gewenste grootte kan worden gesneden.

Voor het verkrijgen van een goede migratie is het noodzakelijk dat het beenmerg weinig vetcellen bevat. Het bleek dat dieren met een gewicht kleiner dan 225 g in het algemeen goed geschikt waren als beenmergdonors. De eis dat uit het beenmerg van de twee femora op uniforme wijze circa 120 stukjes elk van gelijke afmetingen (ca. 0,1 mm^3) moesten kunnen worden gesneden, maakte het ongewenst dieren te gebruiken met een gewicht kleiner dan 130 g. Ook het feit dat lichtere, en dus nog jongere, dieren nog niet in staat zijn een vastenperiode van 24 uur te verdragen, waardoor ook het bloedplasma minder goed bruikbaar wordt, speelde een rol bij het bepalen van deze ondergrens.

In het tijdvak van december tot april werden vaak moeilijkheden ondervonden doordat het beenmerg dan veel rijker aan vetcellen bleek te zijn. Wij hebben getracht dit tegen te gaan door aan de normale voeding extra vitamine C toe te voegen.

Vóór het gebruik werd het beenmerg op zijn vetgehalte beoordeeld met behulp van een praepareermicroscoop, en uitsluitend

voor de proef geschikt geacht wanneer geen vetcellen gezien werden. In sommige gevallen, wanneer slechts plaatselijk opeenhopingen van vetcellen werden aangetroffen, en het bijzonder wenselijk was het beenmerg van het onderhavige dier te kunnen onderzoeken, werden onder het praepareermicroscoop de niet vette delen uitgesneden en voor de proef gebruikt.

Van elk proefdier werden enkele beenmergfragmenten gefixeerd in de fixatievloeistof van L a u d o w s k i en de hieruit vervaardigde praeparaten met haematoxyline-eosine gekleurd. Hierbij werden steeds de met het praepareermicroscoop verkregen bevindingen bevestigd.

Cultuurmedium

Het medium werd samengesteld uit 1 deel caviaplasma met 5 delen physiologische zoutoplossing (Titro-Salz, Nordmark Werke), waarin het te onderzoeken anti-anaemische praeparaat werd opgelost. Het bloedplasma werd verkregen door middel van hartpunctie, hetzij à vue na openen van de thorax, hetzij door „blinde punctie" door de thoraxwand. Indien de proefopstelling het toeliet werd steeds het bloedplasma van de beenmergdonor gebruikt; dit werd gemengd met plasma van een volwassen cavia, daar de hoeveelheid die van een kleine cavia kon worden verkregen niet voldoende was voor een volledige proef.

Cultuurglazen

In verband met de uitvoering van de proeven moesten deze aan de volgende eisen voldoen:

1. De doorsnede moest groot genoeg zijn om 5 beenmerg-explantaten voldoende ver uiteen te kunnen leggen, opdat zij elkaar bij hun migratie niet zouden beïnvloeden.
2. De bodem moest vlak zijn, zodat symmetrisch geplaatste explantaten in een coagulum van gelijke dikte zouden zijn gelegen.
3. De bodem mocht geen vertekening van het beeld veroorzaken daar de migratiezône na projectie gemeten werd.

Na enige moeilijkheden werden bakjes gevonden die aan boven-

staande eisen voldeden [2]). Deze bestaan uit een glazen ring met een doorsnede van 35 mm en een hoogte van 10 - 12 mm, gesneden van een cylindrische glazen buis. De boven- en onderzijde van deze ring zijn glad geslepen, en de onderzijde met behulp van Araldite (Ciba, Basel) op een planparallel glazen plaatje gekit. Deze kitsubstantie bleek bestand te zijn tegen inwerking van bichromaat-zwavelzuur en tegen droge sterilisatie gedurende twee uur bij 200° C., terwijl geen remmende invloed daarvan op de migratie van de explantaten aantoonbaar was.

Schildklierloze dieren

Bij de proeven waarbij schildklierloze dieren werden gebruikt, werd de glandula thyreoidea 6 tot 10 dagen vóór het verrichten van de proef als volgt verwijderd. De cavia werd in narcose gebracht met aether of met nembutal. Wanneer volledige analgesie en spierverslapping waren bereikt, werd het dier in rugligging opgespannen met licht achterovergebogen hals. Na het scheren van de halsstreek werd de huid gekliefd in de mediaanlijn vanaf de mandibula tot voorbij het jugulum en losgemaakt van de fascie. Vervolgens werd ook de fascie mediaan gekliefd en tezamen met de huid naar weerszijden opzij gelegd, waardoor het operatieterrein vrij kwam.

De mm. sternohyoideus en sternothyreoideus werden losgemaakt van de trachea en van de contralaterale spiergroep en zijwaarts weggetrokken. Ter weerszijden naast de trachea werden dan de roodbruine afgekapselde linker en rechter lob van de glandula thyreoidea opgezocht. De beide lobben werden voorzichtig vrij gepraepareerd, de aa. thyreoidea superior en inferior, na deze even stevig te hebben afgeklemd, geruptureerd, waarna de lobben in hun geheel werden verwijderd. Bijzondere zorg was nodig bij het los praepareren van de craniale pool daar deze vaak achter de larynx verbonden was met het bindweefsel om de nervus phrenicus.

Meermalen waren de caudale polen onderling verbonden door een dunne streng schildklierweefsel, die dan tezamen met de beide lobben zonder moeite kon worden verwijderd. Het operatieterrein

---

[2]) Dr. Taconis (Kamerlingh Onnes Laboratorium, Leiden) was zo vriendelijk deze voor ons te ontwerpen en te doen vervaardigen.

werd gecontroleerd op de mogelijke aanwezigheid van accessoire schildklierlobjes, die een enkele maal in de omgeving werden aangetroffen. Hiertoe was het noodzakelijk dat bij de ingreep geen grote bloedingen waren opgetreden. De operatie werd ten slotte beëindigd door de fascie en de huid afzonderlijk te sluiten met een doorlopende naad.

Contrôle op de effectiviteit van de thyreoidectomie werd uitgevoerd nadat de dieren als beenmerg- of als plasmadonor waren gebruikt. Na het verwijderen van de femora resp. het verrichten van de hartpunctie werden, na het afpraepareren van de huid, alle weke delen van de halsstreek uit het cadaver genomen en in formol gefixeerd. De praeparaten werden na inbedden in paraffine in serie gesneden, in coupes met een dikte van 8 μ; elke tiende coupe werd gemonteerd en gekleurd met haematoxyline-eosine, waarna de gehele serie werd onderzocht op de aanwezigheid van schildklierweefsel.

Uitvoering van de ijkingsproeven

1. *Hartpunctie*

De caviae, die de voorafgaande 24 uur geen voedsel hadden gebruikt, werden genarcotiseerd zoals bij de thyreoidectomie beschreven is en in rugligging opgespannen. Vervolgens werd de huid na desinfectie onder steriele voorzorgen geopend in de mediaanlijn vanaf het epigastrium tot in het halsgebied, en naar beide zijden van de thoraxwand afgepraepareerd. Na verwijdering van de mm. pectorales werd de thorax geopend door het sternum juist craniaal van de aanhechting van het diaphragma door te knippen en vanaf de uiteinden van deze opening in craniale richting de costae te klieven. Dwars over het aan de craniale zijde vastzittende deel van de thoraxwand werd een arterieklem bevestigd om de aa. mammariae internae af te sluiten, waarna de lap craniaalwaarts werd omgeklapt. Het hart kwam aldus à vue. Het pericardium parietale werd losgemaakt van de omgeving, het hart gefixeerd met een anatomisch pincet, en de naald van de punctiespuit in de punt van de linker ventrikel ingebracht, waarna door zeer zacht trekken aan de stempel het bloed werd geaspireerd. Voor de aanvang van de punctie werd heparine in de spuit opgezogen. De punctie werd beëindigd als het opzuigen niet vlot meer geschiedde.

Op deze wijze werd van caviae met een gewicht tussen 130 en 225 g 6 à 10 cm^3 bloed verkregen, en van volwassen caviae circa 20 cm^3.

Na beëindiging der punctie werd de cavia gedood door het hart geheel te openen, en het verkregen bloed werd overgebracht in gekoelde, geparaffineerde buizen. Deze werden onmiddellijk gedurende 5 minuten bij 3000 toeren per minuut gecentrifugeerd, het bovenstaande plasma werd afgepipetteerd en bij 4° C. bewaard totdat enige uren later het cultuurmedium werd bereid.

Aangezien het daarbij nodig was een goede coagulatie te verkrijgen van het verdunde plasma zonder weefselextract toe te voegen werd de heparine concentratie zo gering mogelijk gekozen; voor de aanvang der punctie werd in de spuit 0,5 cm^3 0,1% heparine oplossing in physiologische zoutoplossing [3]) per 10 cm^3 af te nemen bloed opgezogen. Het vrijkomen van thromboplastine moest dus zoveel mogelijk worden vermeden daar anders de hoeveelheid heparine onvoldoende was om stolling te voorkomen. Om te verhinderen dat tijdens de punctie, door de contracties van het hart, de tegenoverliggende ventrikelwand werd aangeprikt en zodoende teveel weefselthromboplastine zou worden geaspireerd, werden de puncties uitgevoerd met naalden die van een korte stompe bek voorzien waren. Ook was vanzelfsprekend een vlot verloop van de punctie noodzakelijk.

In een aantal gevallen werd de punctie verricht door na desinfectie van de huid deze in de 5^e intercostaalruimte 5 mm naast de linker sternaalrand en evenwijdig hieraan over een afstand van enkele mm te klieven, (de stompe bek van de hartpunctienaald is niet geschikt om de huid te doorboren), en de naald door de thoraxwandmusculatuur in de hartpunt te brengen. Deze methode werd uitsluitend toegepast bij volwassen caviae waarbij als regel niet meer dan 12 cm^3 bloed werd afgenomen.

2. *Verwijdering der femora*

Van de onder narcose door opening van het hart gedode jonge caviae werd beiderzijds de huid van de achterste extremiteiten

---

[3]) Met de omschrijving „physiologische zoutoplossing" wordt in dit proefschrift steeds bedoeld: „Titro Salz" (Nordmark Werke).

afgepraepareerd vanaf de liesstreek tot onder het kniegewricht. Vervolgens werden de weke delen van het dijbeen verwijderd en de femora zowel proximaal als distaal geëxarticuleerd en in physiologische zoutoplossing bij 4° C. bewaard.

3. *Inzetten van de proef*

Hierbij werden alle gebruikelijke voorzorgen genomen om infectie der cultures te voorkomen.

De femora werden longitudinaal geopend en het beenmerg in toto eruit verwijderd. Nadat dit in enkele delen was gesneden werd het drie maal in een verse druppel physiologische zoutoplossing gewassen en onder het praepareermicroscoop op zijn vetgehalte beoordeeld. Wanneer geen vetcellen werden gezien werd het beenmerg onder een loupe in reepjes gesneden met een breedte en dikte van circa 0,4 mm. Hiervan werden dan stukjes gesneden die ook ongeveer dezelfde lengte bezaten. Alle fragmenten werden tezamen in een druppel physiologische zoutoplossing gebracht. Per proef werden in totaal 120 stukjes vervaardigd, welke vervolgens verdeeld werden over 10 druppels physiologische zoutoplossing.

Inmiddels was een reeks van 9 verdunningen van het te onderzoeken lever- of vitamine B_{12}-praeparaat in physiologische zoutoplossing vervaardigd. Bij het ijken van commerciële anti-anaemische leverpraeparaten werden hiervoor de verdunningen 1/40, 1/80, 1/120, 1/160, 1/200, 1/250, 1/300, 1/400 en 1/600 bereid. Bij de proeven met vitamine B_{12}-praeparaten werden verscheidene andere reeksen verdunningen toegepast, zoals bij de bespreking daarvan zal worden vermeld.

In de cultuurbakjes werden 0,40 cm^3 physiologische zoutoplossing, 0,20 cm^3 plasma en 0,60 cm^3 testvloeistofverdunning met elkaar gemengd, zodanig dat met elke verdunning van het te onderzoeken praeparaat 2 bakjes werden vervaardigd, terwijl in 2 bakjes, die als contrôle werden gebruikt, de testvloeistofverdunning werd vervangen door physiologische zoutoplossing. Op de bodem van elk bakje werden direct na het mengen van het medium 5 beenmergfragmenten gelegd, regelmatig verspreid langs een cirkel concentrisch met de omtrek en daarvan circa 5 mm verwijderd.

In de proeven, waarbij schildklier-explantaten werden toege-

voegd, werden stukjes van een verse caviaschildklier gesneden ter grootte van circa 1 mm^3. Bij het inzetten werd dan tussen elke 2 beenmergstukjes een stukje schildklier gelegd.

Aldus werden 10 paar bakjes klaargemaakt die, nadat in circa 30 minuten het medium was gecoaguleerd, werden afgesloten met in warme paraffine gedompelde vlakke glazen plaatjes.

De cultures werden daarna gedurende 18 uur bij 37° C. geïncubeerd.

4. *Bepaling der migratie*

Na afloop der incubatieperiode werden, na verwijdering van de deksels, de cultuurbakjes op een projectieapparaat volgens E b e l i n g geplaatst (lineaire vergroting 25 maal) en de omtrekken van de explantaten en van hun migratiezônes op transparant papier getekend. De oppervlakte van deze figuren werd gemeten met behulp van een planimeter. Daar de migratiesnelheid binnen zekere grenzen evenredig is aan de grootte van het explantaat werd als maat voor de sterkte der migratie de migratiecoëfficient, d.i. het quotient van de oppervlakten van de migratiezône en van het explantaat, genomen.

5. *Verwerking der uitkomsten*

Op deze wijze werden dus per proef 10 groepen verkregen van elk 10 migratiecoëfficienten afkomstig van de beenmergexplantaten, die aan een bepaalde verdunning van het te onderzoeken praeparaat waren blootgesteld. Van elk dezer groepen werd het rekenkundig gemiddelde berekend, en deze gemiddelde waarden werden uitgezet in een curve waarbij de verdunning van het onderzochte praeparaat op de abscis, en de grootte van de migratiecoëfficient op de ordinaat werd aangegeven. Bovendien werden de gemiddelde waarden per verdunning berekend als percentage van de gemiddelde waarde van de migratiecoëfficienten der contrôlegroep, en eveneens in curve gebracht (procentuele curve).

Met elk praeparaat werden minstens vier proeven uitgevoerd. Alle proeven waarbij het beenmerg een niet te hoog vetgehalte bezat werden gebruikt voor het samenstellen van het eindresultaat, met uitzondering slechts van die proeven waar de gemiddelde

migratiecoëfficient der contrôlegroep lager was dan 40. Bij deze abnormaal slechte migratie geven de onnauwkeurigheden die inhaerent zijn aan het afgrenzen van de niet scherp omlijnde migratiezônes te grote afwijkingen.

Bij het samenstellen van de concentratie-migratie-curve van een bepaald praeparaat werd uitgegaan van de procentuele curves der enkelvoudige proeven. Deze drukt dus uit de gemiddelde migratiebevordering bij verschillende concentraties ten opzichte van de migratie die bij de concentratie nul optreedt.

Hierbij moet worden opgemerkt dat wij niet beschikten over een contrôlevloeistof die van het onderzochte praeparaat slechts verschilde door het ontbreken van het vitamine B_{12}. Wij moesten daarvoor physiologische zoutoplossing gebruiken; eventuele verontreinigingen van het praeparaat kwamen hierin dus niet voor. Wij hebben dan ook de waarde der migratie in het contrôlemedium slechts gebruikt om de verschillende met een bepaald praeparaat uitgevoerde proeven te kunnen samenvoegen. Als criterium voor de migratiebevorderende werkzaamheid van de onderzochte praeparaten hebben wij uitsluitend de vorm van de concentratie-migratie-curve beschouwd, met name de plaats waar de toppen der curves gevonden werden.

In elke groep van 10 explantaten die aan één bepaalde concentratie van het toegevoegde praeparaat waren blootgesteld vonden wij, ook al werden alle explantaten zo uniform mogelijk behandeld, steeds een tamelijk grote spreiding van de afzonderlijke waarden der migratiecoëfficienten. Dit geldt dus evenzeer voor de explantaten in het contrôle-medium (zonder anti-anaemisch praeparaat). Door de aard van de proefopstelling was een statistische toetsing der concentratie-migratie-curves niet uitvoerbaar; wel werd gevonden dat bij bepaalde verdunningen de migratie significant sterker was dan bij de overige verdunningen. Hiermee is noch het exacte verloop der concentratie-migratie-curve, noch de exacte plaats van de toppen dezer curve als betrouwbaar gewaarmerkt. De argumenten om deze toch als zodanig te beschouwen werden ontleend aan het feit dat proeven met hetzelfde praeparaat steeds ongeveer gelijkvormige concentratie-migratie-curves opleverden, en steeds bij vrijwel dezelfde concentratie de migratie maximaal stimuleerden. Overeenkomstige praeparaten leverden curves van ongeveer gelijke vorm op.

De beschreven methodiek, hoewel eenvoudig van opzet, vereist een tamelijk grote routine om reproduceerbare resultaten te verkrijgen. Het snijden van het beenmerg dient gelijkmatig te worden uitgevoerd, met zeer scherpe mesjes, waarbij in één beweging een scherpe scheiding teweeg wordt gebracht. Aan een eenmaal verkregen weefselfragment mag niet meer worden gemanipuleerd om vorm of afmetingen te verbeteren. Daar de migratiecoëfficienten van explantaten van eenzelfde beenmerg slechts onderling vergelijkbaar zijn wanneer de spreiding van de grootten der explantaten binnen vrij nauwe grenzen ligt, moeten alle gebruikte fragmenten ongeveer even groot zijn.

Een tweede kwetsbare phase in de methode is het omtrekken der geprojecteerde migratiezônes. Doordat de celpopulatie per oppervlakte-eenheid van de migratiezône min of meer geleidelijk afneemt met de afstand tot het explantaat is geen scherpe grens ten opzichte van de omgeving aan te geven. Weliswaar is er een vrij duidelijke overgang van een gebied met grote celdichtheid naar de omgeving waarin zich slechts weinig cellen bevinden, doch deze afgrenzing blijft tot op zekere hoogte arbitrair. Het steeds naar dezelfde maatstaven omtrekken der projectiebeelden vereist dan ook een zeker automatisme van degene die de handeling uitvoert. Om deze redenen zijn de beide besproken procedures nooit door ons aan anderen gedelegeerd.

HOOFDSTUK V

Onderzoek naar de werking van vitamine B_{12}-praeparaten

Daar, zoals in hoofdstuk IV werd vermeld, het verkrijgen van betrouwbare uitkomsten afhankelijk is van een met deze methodiek verkregen routine werd aanvankelijk een aantal proeven met reeds geijkte leverpraeparaten verricht. Nadat hiermee reproduceerbare uitkomsten waren verkregen, werd als basis voor het verdere onderzoek een commercieel anti-anaemisch leverextract getoetst.

1. *Onderzoek van leverextract*

Het anti-anaemische leverpraeparaat Pernaemon Forte charge 421 H [4]) werd in onze proefopstelling aan de voedingsbodem toegevoegd in de volgende verdunningenreeks: 1/40, 1/60, 1/80, 1/100, 1/125, 1/150, 1/200 en 1/300.

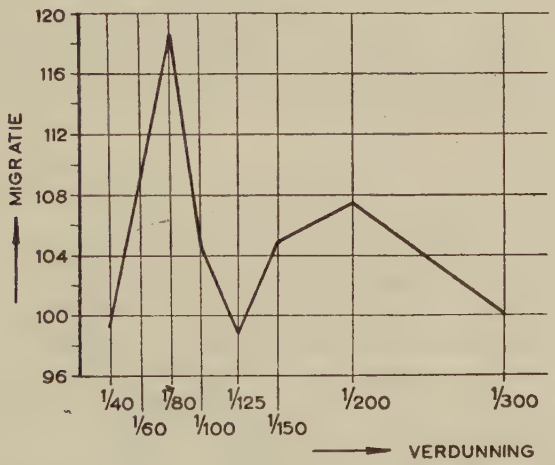


Fig. 1. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met Pernaemon Forte 421 H.

De verkregen concentratie-migratie-curve (fig.1), het gemiddelde van 4 tests, toont een scherpe top bij de verdunning 1/80,

4) De firma Organon (Oss) stelde ons dit praeparaat ter beschikking, waarvoor wij hierbij gaarne onze dank uitspreken.

en een tweede, lagere en bredere, top bij de verdunningen 1/150 - 1/200.

In deze proeven werd bevestigd dat anti-anaemisch leverextract een factor bevat die onder de gegeven omstandigheden in bepaalde concentraties de migratie van cellen uit geëxplanteerd caviabeenmerg bevordert. Bij dit praeparaat werd in de toegepaste stijgende verdunningenreeks de eerste concentratie, waarbij een duidelijke migratiebevordering optrad, gevonden bij de verdunning 1/80 van het leverextract. Deze bevinding stemt overeen met de door Overbeek, Gaillard en de Jongh (1938, 1940) verkregen resultaten bij overeenkomstige leverpraeparaten.

Nadat aldus een standaard concentratie-migratie-curve van een leverextract was verkregen, werd het mogelijk over te gaan tot het onderzoeken van vitamine B_{12}-praeparaten.

2. *Onderzoek van vitamine* B_{12}*-praeparaten*

Teneinde bij benadering te bepalen welk verdunningentraject moest worden toegepast, werd uitgegaan van het vitamine B_{12}-gehalte van het onderzochte Pernaemon Forte 421 H. Dit gehalte was niet microbiologisch bepaald, doch werd door de fabrikant geschat op 4 tot 5 γ per cm^3.

a. Het eerste praeparaat (charge nr 211248) dat wij ter beschikking kregen [5]) was een oplossing van circa 2 γ vitamine B_{12} per cm^3, en het werd aan het medium toegevoegd in de verdunningen 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/62,5, 1/75, 1/100 en 1/150.

Wij konden met dit praeparaat 3 proeven uitvoeren; de hieruit samengestelde concentratie-migratie-curve is afgebeeld in fig. 2. Deze curve toont een duidelijke top bij de concentratie 1/20. In de daarop volgende daling lijkt bij de verdunning 1/40 misschien nog een tweede top voor te komen. Bij de verdunning 1/75 was de migratie duidelijk geringer dan bij de overige verdunningen.

b. Vervolgens onderzochten wij het vitamine B_{12}-praeparaat 2/A/O/1 [5]), dat circa 4 γ vitamine B_{12} per cm^3 bevatte. Hiermee

---

[5]) Deze praeparaten werden ons ter beschikking gesteld door de firma Organon (Oss).

werd de volgende reeks verdunningen ingezet: 1/20, 1/40, 1/60, 1/80, 1/100, 1/125, 1/150 en 1/200.

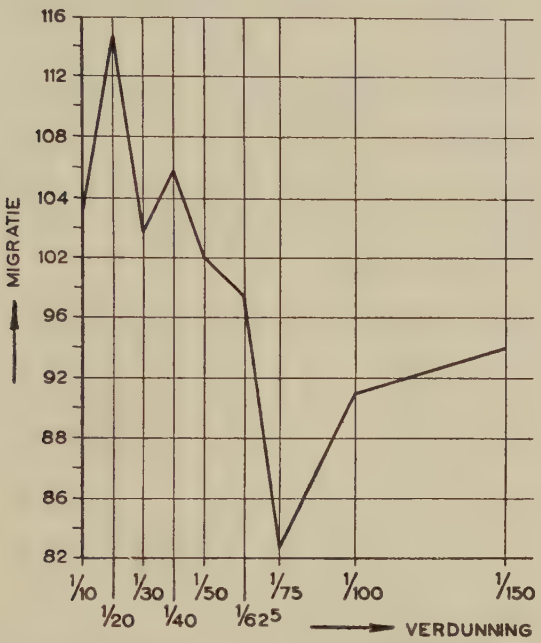


Fig. 2. Concentratie-migratie-curve van 3 proeven met praeparaat 211248.

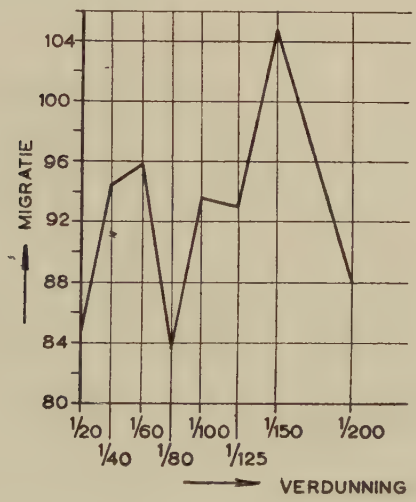


Fig. 3. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met praeparaat 2/A/O/1.

Een serie van 4 proeven werd uitgevoerd. De hieruit verkregen concentratie-migratie-curve (fig. 3) toont een eerste top bij de verdunningen 1/40 en 1/60, en een tweede hogere top bij de verdunning 1/150.

c. Hierna werd een vitamine B_{12}-praeparaat onderzocht dat ons door de firma Merck (Rahway, N.J.) ter beschikking was gesteld, en dat onder de naam Cobione in de handel was. Dit praeparaat bevatte circa 10 γ vitamine B_{12} per cm^3, en werd door ons met steriele physiologische zoutoplossing verdund tot een concentratie van 4 γ vitamine B_{12} per cm^3.

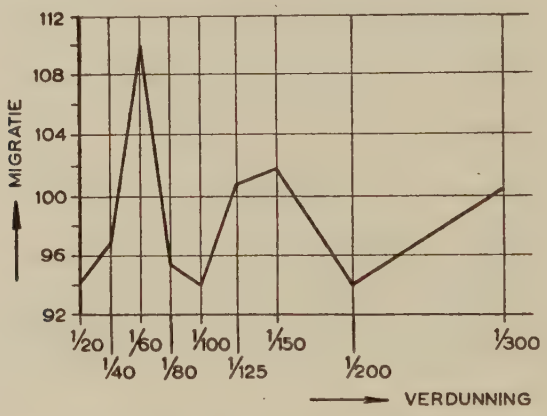


Fig. 4. Concentratie-migratie-curve van 6 proeven met praeparaat „Cobione".

Hiermede konden 6 proeven worden verricht, in dezelfde verdunningen reeks als bij het voorgaande praeparaat. De concentratie-migratie-curve (fig. 4) toont een scherpe top bij de verdunning 1/60 en een tweede, lagere, bij de verdunningen 1/125 en 1/150.

d. In de vierde plaats werd kristallijn vitamine B_{12} (Merck, Rahway, N.J.) in de apotheek van het Academisch Ziekenhuis te Leiden voor ons opgelost in physiologische zoutoplossing. Wij hebben het verder verdund tot een oplossing die ruim 10 γ vitamine B_{12} per cm^3 moest bevatten, en gesteriliseerd door een Seitz filter.

Een gedeelte der verkregen oplossing werd in aansluiting hieraan in steriele ampullen uitgevuld. Deze charge wordt genoemd praeparaat 291051.

Het overige deel der vitamine B_{12}-oplossing werd in een steriele buis bewaard bij 4° C. en na 4½ maand in steriele ampullen uitgevuld: praeparaat 110352.

Bij microbiologische ijking [6]) bleek in praeparaat 291051 het vitamine B_{12} gehalte 14,5 γ per cm^3 te bedragen. Praeparaat 110352 bevatte slechts 9,1 γ vitamine B_{12} per cm^3.

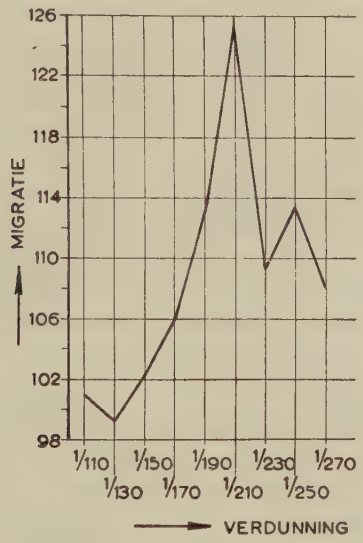


Fig. 5. Concentratie-migratie-curve van 6 proeven met praeparaat 291051.

Daar het voor de komende onderzoekingen van belang was het traject dicht om de eerste actieve concentratie nauwkeurig na te gaan werd praeparaat 291051 getoetst in de verdunningenreeks 1/110, 1/130, 1/150, 1/170, 1/190, 1/210, 1/230, 1/250 en 1/270. Uit de concentratie-migratie-curve (fig. 5) blijkt dat deze top bijna geheel in dit verdunningentraject werd gevangen. Bij de verdunning 1/210 werd de migratie maximaal bevorderd.

Praeparaat 110352 werd om dezelfde reden getoetst in de verdunningen 1/70, 1/90, 1/110, 1/130, 1/150, 1/170, 1/190, 1/210 en 1/230. De concentratie-migratie-curve (fig. 6) toont dat de top voor dit praeparaat gelegen is bij de verdunning 1/130.

---

[6]) Dr. Faber (firma Philips Roxane, Weesp) was zo vriendelijk deze voor ons uit te voeren.

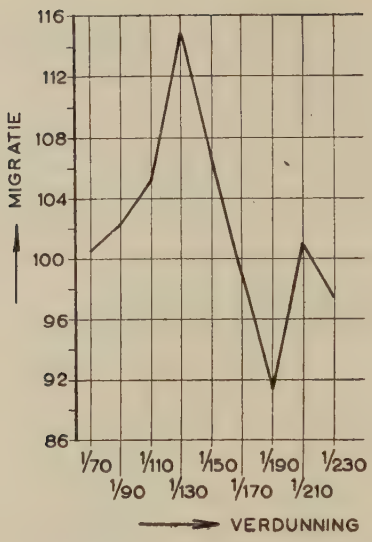


Fig. 6. Concentratie-migratie-curve van 5 proeven met praeparaat 110352.

Discussie

a. *Vergelijking van het vitamine* B_{12}*-gehalte van de onderzochte praeparaten.*

Bij de toetsingen van deze vitamine B_{12}-praeparaten bleek dat alle bij bepaalde concentraties een migratie bevorderende werking uitoefenden. Om hieruit conclusies aangaande de activiteit van zuiver vitamine B_{12} in onze proefopstelling te kunnen trekken, zullen wij het vitamine B_{12}-gehalte der onderzochte praeparaten onderling vergelijken.

Ten tijde van het onderzoek werd slechts van de sub d. genoemde praeparaten 291051 en 110352 het vitamine B_{12}-gehalte microbiologisch bepaald. Het is vrijwel zeker dat niet alle praeparaten inderdaad nog het opgegeven gehalte aan vitamine B_{12} bezaten. Volgens mededeling van S m i t h (1949) is het vitamine B_{12} in oplossingen met een geringe concentratie niet bestendig. Praeparaat 211248 was in een oplossing die slechts 2 γ vitamine B_{12} per cm^3 bevatte gedurende $\frac{1}{2}$ jaar bewaard voor het door ons getoetst werd. Van praeparaat 2/A/O/1 was de concentratie hoger en de bewaarduur korter, terwijl het Cobione in een oplossing met 10 γ vitamine B_{12} per cm^3 werd gehouden tot kort voor de experimenten.

In de eerste plaats vergelijken wij dus de praeparaten 291051 en 110352, waarvan het vitamine B_{12}-gehalte bekend is. Praeparaat 291051 bevat 14,5 γ vitamine B_{12} per cm^3 en toont in de concentratie-migratie-curve de eerste top bij de verdunning 1/210. Van praeparaat 110352, dat 9,1 γ vitamine B_{12} per cm^3 bevat, verwachten wij de eerste top dezer curve bij de verdunning $1/(\frac{9,1}{14,5} \times 210) = 1/132$. De gevonden top blijkt inderdaad met de berekende overeen te komen en de verdunning, waarbij de eerste top in de concentratie-migratie-curve optreedt lijkt dus een betrouwbare maatstaf voor het vitamine B_{12}-gehalte van het praeparaat te zijn.

Met behulp van deze maatstaf hebben wij, uitgaande van de concentratie-migratie-curve van praeparaat 291051, het vitamine B_{12}-gehalte der overige praeparaten berekend. (tabel 1).

Tabel I

Praeparaat	Plaats van de eerste top in de conc.-migr.-curve	Berekend vit.B_{12} gehalte	Opgegeven gehalte van het praeparaat
291051	1/210	14,5 γ per cm^3	14,5 γ/cm^3
110352	1/130	$\frac{130}{210} \times 14,5 = 9,0\ \gamma/cm^3$	9,1 γ/cm^3
211248	1/20	$\frac{20}{210} \times 14,5 = 1,4\ \gamma/cm^3$	2 γ/cm^3
2/A/0/1	1/50	$\frac{50}{210} \times 14,5 = 3.5\ \gamma/cm^3$	4 γ/cm^3
Cobione	1/60	$\frac{60}{210} \times 14,5 = 4,1\ \gamma/cm^3$	4 γ/cm^3

Uit deze berekening blijkt dat in het Cobione, dat in een oplossing met 10 γ vitamine B_{12} per cm^3 werd bewaard, het vitamine B_{12} onverminderd aanwezig is gebleven. In de andere praeparaten is het vitamine B_{12}-gehalte iets afgenomen in praeparaat 2/A/O/1, en sterker afgenomen in praeparaat 211248.

De gevonden getallen stemmen dus overeen met wat wij op grond van de oorspronkelijke concentratie en bewaarduur mochten verwachten. Wij menen daarom te mogen concluderen dat het vitamine B_{12} in onze proefopstelling een constante migratiebevorderende activiteit uitoefent, zodanig dat de verdunning, waarbij

de eerste top in de concentratie-migratie-curve optreedt, een maat is voor het gehalte aan vitamine B_{12} van het onderzochte praeparaat.

b. *Vergelijking van de vitamine B_{12}-praeparaten met het Pernaemon Forte 421 H.*

Het onderzoek der vitamine B_{12}-praeparaten toont aan dat vitamine B_{12} evenals anti-anaemisch leverextract in onze proefopstelling een migratiebevorderende activiteit bezit in bepaalde concentraties. Het is dus zeer waarschijnlijk dat deze activiteit van de anti-anaemische leverpraeparaten veroorzaakt wordt door het daarin aanwezige vitamine B_{12}. Er rest echter nog de vraag of het vitamine B_{12} de enige factor in deze leverextracten is die verantwoordelijk is voor de stimulering der migratie. Om hierin inzicht te verkrijgen vergelijken wij de concentratie-migratie-curves der vitamine B_{12}-praeparaten met die van Pernaemon Forte 421 H.

1. *Concentratie der migratiestimulerende factor.*

Indien het vitamine B_{12} alléén verantwoordelijk is voor het migratiebevorderend effect van het leverextract, dan kunnen wij het vitamine B_{12}-gehalte van Pernaemon Forte 421 H bepalen aan de hand van onze proef met het vitamine B_{12}-praeparaat 291051, op dezelfde wijze als waarop de vitamine B_{12}-concentraties der overige praeparaten werden berekend.

De concentratie-migratie-curve van Pernaemon Forte 421 H toont zijn eerste top bij de verdunning 1/80. Het vitamine B_{12}-gehalte zou dan bedragen $\frac{80}{210} \times 14{,}5 = 5{,}5\ \gamma$ vitamine B_{12} per cm^3. Deze uitkomst is iets hoger dan het gehalte dat de fabrikant in dit leverextract aanwezig veronderstelde. De opgegeven waarde berustte slechts op een globale schatting, die op ons verzoek uitsluitend verstrekt werd om de orde van grootte van de reeksen verdunningen voor de vitamine B_{12}-proeven te kunnen vaststellen. Uit dit verschil mag daarom niet de conclusie getrokken worden dat het leverextract naast het vitamine B_{12} een of meer andere migratiestimulerende factoren bevat.

2. *Vorm der concentratie-migratie-curve.*

Teneinde het verloop van de concentratie-migratie-curves van het Pernaemon Forte 421 H en van de vitamine B_{12}-praeparaten te kunnen vergelijken, hebben wij de curves der vitamine B_{12}-praeparaten uitgezet zoals het verloop zou zijn geweest, indien hun gehalte aan vitamine B_{12} gelijk was aan het berekende vitamine B_{12}-gehalte van het Pernaemon Forte.

Van praeparaat 211248 was de uitgangsconcentratie $\frac{1,4}{5,5}$ = circa $\frac{1}{4}$ van de vitamine B_{12}-concentratie van Pernaemon Forte 421 H, zodat de verdunningen 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/62,5 en 1/75 overeen komen met resp. de verdunningen 1/40, 1/80, 1/120, 1/160, 1/200, 1/250 en 1/300 van Pernaemon Forte 421 H. In figuur 7 zijn beide curves afgebeeld.

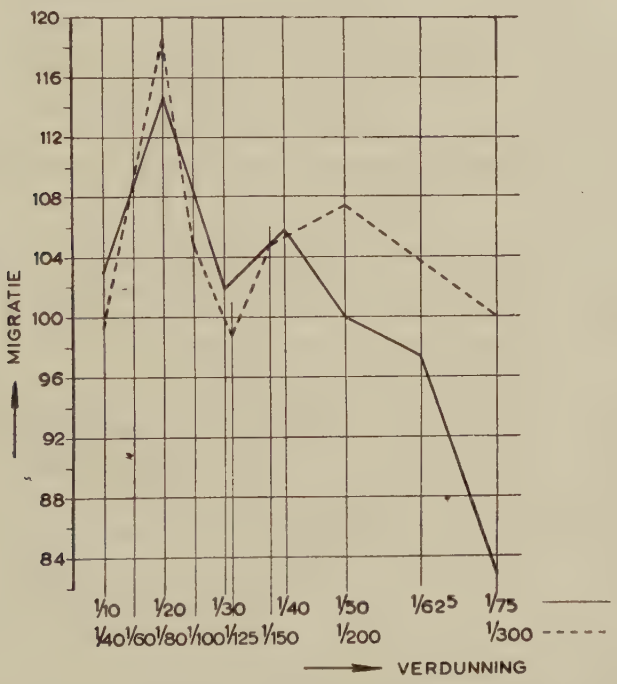


Fig. 7. Vergelijking van de concentratie-migratie-curves van praeparaat 211248 (———) en van Pernaemon Forte 421 H (- - - - -) (zie tekst).

Op overeenkomstige wijze is in figuur 8 de concentratie-migratie-curve van praeparaat 2/A/O/1, waarvan het vitamine B_{12}-gehalte $\frac{3,5}{5,5}$ = circa $\frac{2}{3}$ van de vitamine B_{12}-concentratie van het Pernaemon Forte 421 H bedroeg, uitgezet. Om de vergelijking te vereenvoudigen, is hierbij de curve t.o.v. de contrôle verplaatst.

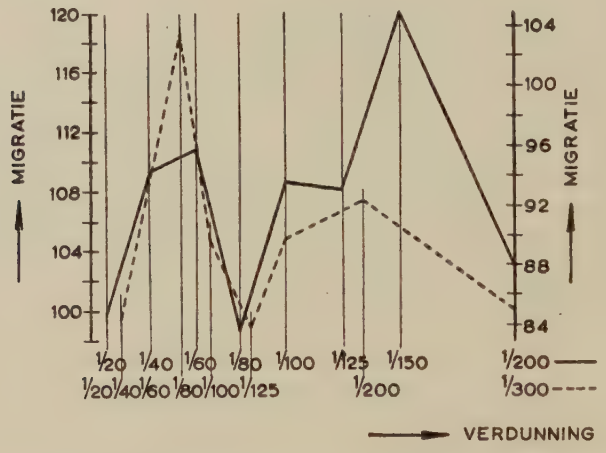


Fig. 8. Vergelijking van de concentratie-migratie-curves van praeparaat 2/A/O/1 (——) en van Pernaemon Forte 421 H (------) (zie tekst).

Figuur 9 toont de concentratie-migratie-curve van het Cobione, dat $\frac{4,1}{5,5}$ = circa $\frac{3}{4}$ van het vitamine B_{12}-gehalte van Pernaemon Forte 421 H bezat.

De eerste top in de concentratie-migratie-curves der vitamine B_{12}-praeparaten valt vanzelfsprekend samen met de eerste top in de concentratie-migratie-curve van Pernaemon Forte 421 H. Het blijkt dat al deze curves in dit gebied van verdunningen nog een tweede top tonen. Voor Pernaemon Forte 421 H ligt deze bij de verdunning 1/200. Praeparaat 211248 heeft de tweede top bij verdunning 1/160 (fig. 7). De tweede top van praeparaat 2/A/O/1 ligt bij de verdunning 1/225 (fig. 8); hierbij valt op dat deze hier hoger is dan de eerste top, in tegenstelling tot de bevinding bij de andere praeparaten. In de concentratie-migratie-curve van het Cobione vindt men de tweede top bij de verdunning 1/200 (fig. 9).

Het is opvallend dat juist de curve van het praeparaat waarin geen verlies van vitamine B_{12} lijkt te zijn opgetreden, bijna identiek is met de concentratie-migratie-curve van het leverextract.

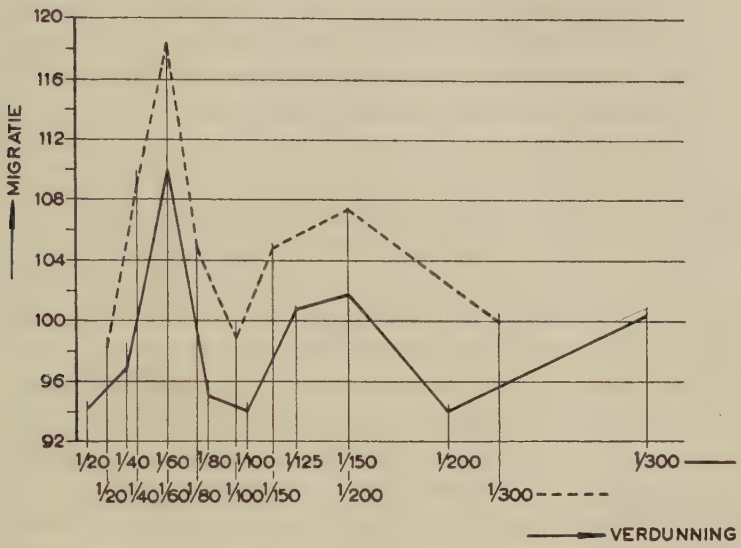


Fig. 9. Vergelijking van de concentratie-migratie-curves van praeparaat „Cobione" (——) en van Pernaemon Forte 421 H (- - - - -) (zie tekst).

De toegepaste verdunningen van het Pernaemon Forte 421 H en van de vitamine B_{12}-praeparaten vallen na de omrekening tot aequivalente waarden uiteraard niet volkomen samen. Een onderlinge vergelijking kan dus niet geheel exact zijn, temeer daar de omrekeningswaarden ook globaal genomen zijn. Alle onderzochte vitamine B_{12}-praeparaten geven een tweede top in hun concentratie-migratie-curve te zien bij een verdunning die niet ver verwijderd is van de verdunning, waarbij ook Pernaemon Forte 421 H een tweede top toont.

Ook het verloop der concentratie-migratie-curves in het onderzochte gebied van verdunningen wijst er dus niet op dat in het leverextract nog een andere migratiebevorderende factor naast het vitamine B_{12} werkzaam is.

c. *Het mechanisme van de reactie.*

De uitkomsten van onze experimenten tonen aan dat het vitamine B_{12} evenals anti-anaemisch leverextract, in een bepaalde

concentratie de migratie van losse cellen, voornamelijk granulocyten, uit explantaten van caviabeenmerg bevordert.

Het phaenomeen der migratiebevordering verschilt aanzienlijk van het bekende effect van de behandeling met leverextract en vitamine B_{12} op de bloedvorming bij pernicieuze-anaemiepatiënten. Daar treedt een verandering op van megaloblastaire naar normoblastaire erythropoiese; in het periphere bloed ontstaat een toename van het aantal erythrocyten, samengaand met een vermindering van het gemiddelde celvolume en de gemiddelde haemoglobine-concentratie per erythrocyt; de overlevingsduur der gevormde erythrocyten verkrijgt normale waarden; een eventuele leuco- en thrombopenie worden opgeheven; en de hypersegmentatie der granulocyten verdwijnt.

De positie van de gevonden verschijnselen in het beeld van wat tot dusver over de activiteit van het vitamine B_{12} bekend is, verdient een nadere bespreking. Zoals in hoofdstuk II vermeld werd, is in de litteratuur de invloed van vitamine B_{12}, in vitro toegevoegd, op beenmergcultures meestal beoordeeld naar het effect op de rijping van megaloblasten. De auteurs die daarbij het beenmerg in suspensie kweekten naar analogie van de door Osgood ontworpen methode, zagen door toevoeging van vitamine B_{12} in vitro geen rijpingsbevordering optreden (Lajtha 1950, Franco c.s. 1951, Thompson 1952). Hoewel van verschillende zijden (Feinmann 1952, Reisner 1953) erop gewezen wordt dat het moeilijk is met deze methode betrouwbare gegevens te verkrijgen, krijgt men hieruit toch de indruk dat het vitamine B_{12} alvorens het zijn functie bij de normalisering van de erythropoiese kan vervullen, nog een verandering ondergaat. Dit lijkt ook voor andere functies te gelden; Doctor c.s. (1953) vonden dat de vorming van citrovorum factor uit folinezuur door leverhomogenaten van vitamine B_{12}-deficiënte kuikens niet toeneemt door toevoeging van vitamine B_{12} in vitro, terwijl toediening in vivo van het vitamine wel een duidelijke vermeerdering veroorzaakte.

De omstandigheid dat het vitamine B_{12} in serum en in weefsel hoofdzakelijk in een aan eiwit gebonden vorm wordt aangetroffen, zou erop kunnen duiden dat het zijn functie slechts kan uitoefenen na koppeling aan een proteine (zie ook pag. 9). De experimenten van Horrigan c.s. (1950, 1952) zouden dan wel aantonen dat

deze koppeling gelocaliseerd in beenmergweefsel kan plaats vinden. Ook bloedserum is in staat in vitro toegevoegd vitamine B_{12} gedeeltelijk in gebonden vorm om te zetten. (Mollin c.s. 1955); het is echter gebleken dat het eiwit, waaraan vitamine B_{12} wordt gekoppeld in de lever een ander is dan in het bloed (Pitney c.s. 1954). Mogelijk is dit een aanwijzing voor het bestaan van een orgaan-specificiteit ten opzichte van de inwerking van het vitamine B_{12}.

In onze proeven zien we wel een activiteit van het vitamine B_{12} dat in vitro toegevoegd wordt; er is dus voor deze werking geen binding aan eiwit nodig, of wel een binding aan de bloedplasma eiwitten van het medium is hiervoor voldoende. De mogelijkheid bestaat dat het vitamine B_{12} de migratie slechts bevordert doordat het in bepaalde concentraties de structuur van het gecoaguleerde medium wijzigt, b.v. door het patroon van het fibrine-netwerk te veranderen, waardoor de granulocyten zich sneller kunnen verplaatsen. In een geheel verschillende proefopstelling verkregen Meier c.s. (1955) resultaten, waarvoor een analoge ontstaanswijze in aanmerking komt. Deze onderzoekers kweekten kippenleucocyten in een medium dat kippenplasma en embryonenextract bevatte. Het toevoegen van antisera tegen kippenweefsels in een bepaalde concentratie veroorzaakte een toename van de migratie der leucocyten. Wanneer een praecipiterend antiserum werd geincubeerd met kippenplasma en het gevormde praecipitaat werd afgecentrifugeerd, had de bovenstaande vloeistof geen migratiebevorderende werking, het praecipitaat na oplossing in physiologische zoutoplossing echter wel. Het ligt voor de hand hierbij aan een physico-chemische verandering van het medium als oorzaak van de migratiebevordering te denken.

Anderzijds zijn in de litteratuur ook proeven beschreven, waarbij dergelijke structuurveranderingen van het medium niet in aanmerking lijken te komen voor het verklaren van de vitamine B_{12}-werking in vitro. Zo vermeldden Reisner c.s. (1953) dat vitamine B_{12} een groeibevorderend effect uitoefende op een beenmergfragment dat gekweekt werd in een medium met serum van een pernicieuze-anaemiepatiënt. Grunbaum c.s. (1955) deelden mede dat bij het kweken van kuikenhart-fibroblasten toevoeging van vitamine B_{12} aan het medium in staat was de vervetting van ouder wordende cultures te verhinderen. Bovendien veroorzaakte

het een sterkere groei, waarbij de grootte van de groeizônes gelijk was aan die der contrôle-cultures, doch de celpopulatie dichter. In de beschrijving van Reisner c.s. (1953) en Swan c.s. (1955), die waarnamen dat vitamine B_{12} de groei van beenmerg-explantaten bevorderde (zie pag. 16) zijn geen aanwijzingen voor het mechanisme van die groeibevordering aanwezig.

Over een mogelijke invloed van vitamine B_{12} op de migratie van leucocyten uit het beenmerg in vivo zijn in de litteratuur vrijwel geen gegevens te vinden. Spies (1949) vond geen effect van vitamine B_{12}-toediening bij patiënten met een leucopenie voorkomend bij diverse toestanden. Jürgens c.s. (1951) verkregen bij ratten, waarbij door middel van succinylsulfathiazol een leucopenie was opgewekt, geen verbetering met vitamine B_{12}. Dinning c.s. (1952) brachten met een dieet, deficiënt aan methionine, bij ratten een leucopenie teweeg, die kon worden opgeheven door gecombineerde toediening van vitamine B_{12} en dimethylaminoazobenzeen. In deze gevallen gaat het waarschijnlijk eerder om een herstel van de leucopoiese dan om een migratie van leucocyten uit het beenmerg.

Alleen de waarneming van Strauss c.s. (1952) zou wel op dit laatste betrekking kunnen hebben; deze auteurs zagen bij twee patiënten met een ziektebeeld dat zich voordeed als een myeloide leukaemie, een overwegend granulocytair beenmerg op dramatische wijze normaal worden na behandeling met vitamine B_{12}. Bij leukaemie is geen gunstig effect van vitamine B_{12} te verwachten, zoals o.a. uit het onderzoek van Welsh (1952) blijkt. In serum van patiënten met een myeloide leukaemie vindt men een extreem hoge concentratie van vitamine B_{12}, die daalt bij het optreden van spontane of geïnduceerde remissies. De vitamine B_{12}-bindingscapaciteit van het serum is bij deze patiënten ook sterk verhoogd. (Beard c.s. 1954, Mollin c.s. 1955). Over de betekenis van deze bevindingen zijn op dit moment nog vele speculaties mogelijk. Hoewel in de publicatie van Strauss c.s. het vitamine B_{12}-gehalte van het serum van de patiënten niet is vermeld, kan een leukaemie wel uitgesloten worden geacht; het beschreven beenmergbeeld kan berust hebben op een „migration arrest".

Van de „leucocytosis promoting factor", die voorkomt in abscessen en het bloed bij proefdieren en waarmee bij normale dieren een verhoging van het aantal neutrophiele granulocyten kan wor-

den opgeroepen (Menkin 1940, 1942a, 1942b, 1943; Harris c.s. 1956) is geen verband met vitamine B_{12} bekend.

De zeer schaarse gegevens uit de litteratuur zijn onvoldoende om een aanwijzing in enige richting te geven.

Tenslotte moet nog worden opgemerkt dat de maximale migratie-bevordering in onze proefopstelling optreedt bij een vitamine B_{12}-concentratie die enige honderden malen groter is dan de normale concentratie van dit vitamine in het bloed. De sterkste migratie vonden wij bij een verdunning 1/210 van een praeparaat dat 14,5 γ vitamine B_{12} per cm^3 bevatte, waarbij dus $\frac{14,5}{210} = 69$ $m\gamma$ per cm^3 aan het medium werd toegevoegd. In het bloedserum van normale individuen vonden Beard c.s. (1954) een vitamine B_{12}-gehalte tussen 0,086 en 0,460 $m\gamma$, met een gemiddelde van 0,212 $m\gamma$ per cm^3. Mollin c.s. (1955) vonden in een wat groter materiaal iets hogere waarden: gemiddeld 0,362 $m\gamma$ per cm^3, met als uitersten 0,100 en 0,900 $m\gamma$. Van meer belang zou zijn te weten welke concentraties in het beenmerg bereikt kunnen worden. Hierover zijn nog geen onderzoekingen bekend. Wel vonden de laatstgenoemde auteurs echter in diverse organen een vitamine B_{12}-gehalte van dezelfde orde van grootte als dat van het door ons toegepaste medium. In de lever vonden Pitney c.s. (1954) nog aanzienlijk hogere concentraties n.l. gemiddeld 280 $m\gamma$ vitamine B_{12} per gram vers leverweefsel.

Conclusies

1. Het vitamine B_{12} heeft, evenals anti-anaemische leverextracten, in een bepaalde concentratie een migratiebevorderende werking op explantaten van caviabeenmerg.
   Deze is constant reproduceerbaar, en kan gebruikt worden als basis voor andere experimenten, zoals het onderzoek naar de mogelijke invloed van de schildklier op deze werking.

2. Ons onderzoek gaf geen aanwijzingen voor het voorkomen van andere migratiebevorderende substanties in anti-anaemische leverextracten.
   De door Overbeek, Gaillard en de Jongh ontwor-

pen ijkingsmethode voor anti-anaemische leverextracten berust vermoedelijk uitsluitend op het vitamine B_{12}-gehalte daarvan.

3. Over de wijze waarop het vitamine B_{12} de migratie uit explantaten van caviabeenmerg bevordert, kan nog geen oordeel worden uitgesproken.
   Naast de mogelijkheid van een aangrijpen op de amoeboïde bewegelijkheid van granulocyten, bestaat de mogelijkheid van een indirecte beïnvloeding hiervan door middel van een verandering in de structuur van het coagulum.

HOOFDSTUK VI

De invloed van de schildklier

Nu gebleken was dat het vitamine B_{12} in een bepaalde concentratie een duidelijke migratiebevorderende activiteit uitoefent op caviabeenmerg in vitro, konden wij het onderzoek naar de invloed van de schildklier uitvoeren met gebruikmaking van een oplossing van het kristallijne vitamine.

Om de vraag te beantwoorden of voor de migratiestimulerende werking van het vitamine B_{12} de aanwezigheid van een functionnerende schildklier noodzakelijk is, werden experimenten verricht waarbij het beenmerg of het bloedplasma, of beide, afkomstig waren van schildklierloze caviae. Daarbij werd nagegaan of het vitamine B_{12} ook onder deze omstandigheden de migratie van cellen uit het explantaat bevordert. Als criterium voor de beoordeling werd aangenomen het aanwezig zijn van een bevordering van de migratie bij de optimale concentratie van het gebruikte praeparaat, zoals die bij de in het vorige hoofdstuk beschreven ijkingen was gevonden.

Experimenten

De volgende series proeven werden verricht:

1. Een serie proeven waarbij zowel het beenmergexplantaat als het plasma afkomstig was van schildklierloze caviae.

In totaal werden 4 proeven uitgevoerd met het vitamine B_{12}-praeparaat 291051 in de reeks verdunningen 1/110 - 1/270. Bij een van deze proeven was in de beide caviae waarvan het materiaal was gebruikt nog een tamelijk groot stuk schildklier achtergebleven. De concentratie-migratie-curve van deze proef toonde een sterke migratiebevordering bij de verdunning 1/210, en kwam volkomen overeen met de curve die het praeparaat in de proeven

met van normale dieren afkomstig materiaal had opgeleverd (zie hoofdstuk V, 2 d, fig. 5).

Bij de overige 3 proeven werd geen schildklierweefsel gevonden bij de microscopische contrôle van de halsstreek der geopereerde dieren, behoudens een zeer klein stukje, bestaande uit circa 10 follikels, dat in een beenmergdonor werd aangetroffen. In 2 van deze proeven toonde de concentratie-migratie-curve een vlak verloop; de derde gaf volkomen afwijkende schommelingen te zien. In fig. 10 is afgebeeld de gemiddelde concentratie-migratie-curve van de 3 proeven (getrokken lijn). Dat de schommelingen hierin uitsluitend door één der proeven worden veroorzaakt, blijkt uit de curve van de 2 overige (onderbroken lijn).

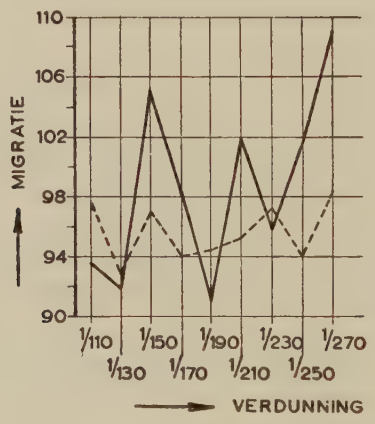


Fig. 10. Concentratie-migratie-curve van vitamine B_{12}-praeparaat 291051; beenmerg en bloedplasma beide afkomstig van schildklierloze caviae. (——— 3 proeven; - - - - - 2 proeven).

2. Een serie van 4 proeven waarbij het beenmergexplantaat genomen was van een schildklierloze cavia, doch het medium niet. Voor dit laatste werd het bloedplasma van een normale volwassen cavia gebruikt, dat in dit geval niet met het plasma van de beenmergdonor werd gemengd.

In 1 der proeven werd in het obductiemateriaal over een dikte van circa 40 coupes een klein fragment thyreoidweefsel aangetroffen, bij de overige geopereerde dieren was geen schildklierweefsel meer te vinden.

Twee van de proeven in deze serie werden uitgevoerd met prae-

paraat 291051, de overige met praeparaat 110352. Van beide praeparaten toonde één proef een abnormaal wisselend en één proef een vlak verlopende curve. Om uit deze 4 proeven een concentratie-migratie-curve samen te stellen werden de met praeparaat 110352 verkregen waarden samengenomen met de uitkomsten die praeparaat 291051 in overeenkomstige verdunningen had opgeleverd. Hiertoe werden de vitamine B_{12}-concentraties van de onderscheidene verdunningen berekend. Voor het samenstellen van de in fig. 11 afgebeelde concentratie-migratie-curve zijn alle waarden herleid tot de reeks verdunningen van praeparaat 110352, teneinde vergelijking met de standaard-curve mogelijk te maken. Deze herleiding was alleen mogelijk in het verdunningentraject 1/70 - 1/170.

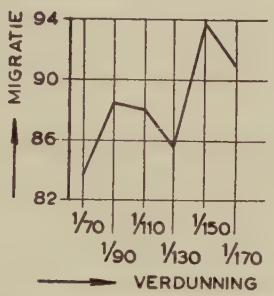


Fig. 11. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met de vitamine B_{12}-praeparaten 291051 en 110352; beenmerg van een schildklierloze cavia, bloedplasma van een normale cavia afkomstig. (Alle waarden herleid tot de reeks verdunningen van praeparaat 110352).

3. Een serie van 5 proeven met beenmerg van een normale cavia, geëxplanteerd in een medium met plasma van een schildklierloze cavia. Ook hier werd vanzelfsprekend geen autoloog plasma gebruikt bij de samenstelling van het medium.

Slechts in één van de proeven was bij microscopische contrôle van de hals nog een klein stukje schildklier te vinden. Het verloop van de concentratie-migratie-curve van deze proef was grillig, en leek niet op een voor vitamine B_{12} typische curve. De concentratie-migratie-curve van de overige proeven is afgebeeld in fig. 12.

De experimenten van deze serie, die uitgevoerd werden met praeparaat 291051, leverden alle grillig verlopende curves op. In 2 proeven waren bij de projectie vele explantaten moeilijk te om-

grenzen. Deze overigens weinig voorkomende omstandigheid doet afbreuk aan de betrouwbaarheid van de verkregen waarden.

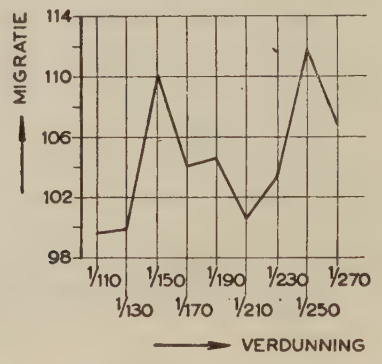


Fig. 12. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 291051; beenmerg van een normale cavia, bloedplasma van een schildklierloze cavia afkomstig.

Vervolgens werden 3 series experimenten uitgevoerd met bijna dezelfde proefopstelling als de voorgaande series, hiervan slechts afwijkend doordat bij het inzetten in elk cultuurbakje 5 stukjes vers caviaschildklier-weefsel werden toegevoegd.

In deze series werd uitsluitend het vitamine B_{12}-praeparaat 110352 gebruikt.

4. Een serie bestaande uit 4 proeven met beenmerg en plasma beide van schildklierloze caviae, waarbij per cultuurbakje 5 stukjes verse schildklier werden toegevoegd.

Bij contrôle van het obductiemateriaal werd slechts bij 1 van de 8 geopereerde dieren (een beenmergdonor) een fragment schildklierweefsel gevonden. De grootste afmeting hiervan was circa 700 μ, terwijl het in 40 opeenvolgende coupes van 8 μ dikte was te vervolgen. Daar, zoals in de discussie zal worden besproken, schildklierfragmenten van dergelijke afmetingen onze uitkomsten niet leken te beïnvloeden, hebben wij deze proef niet uit de serie weggelaten. Indien daarentegen aan deze schildklierrest wel betekenis zou moeten worden toegekend, dan zou men deze proef moeten rangschikken bij serie 6; dit zou de uiteindelijke interpretatie niet in ongunstige zin veranderen.

In één proef van deze serie had de concentratie-migratie-curve

een vlak verloop; in de overige 3 had de curve een vorm zoals het vitamine B_{12} onder normale omstandigheden geeft. Doordat de top der curve in 2 van de 3 gevallen bij de verdunning 1/110 was gelegen in plaats van bij de verdunning 1/130, komt deze gelijkenis in de concentratie-migratie-curve van de gezamenlijke proeven minder pregnant tot uitdrukking dan mogelijk in werkelijkheid het geval is (fig. 13).

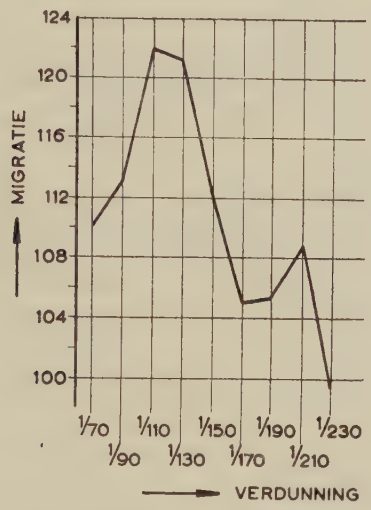


Fig. 13. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 110352; beenmerg en bloedplasma beide van schildklierloze caviae afkomstig. Schildklierfragmenten in vitro toegevoegd.

5. Een serie van 4 proeven met beenmerg afkomstig van een schildklierloze cavia, geëxplanteerd in een medium met normaal plasma, waarbij per cultuurbakje 5 stukjes verse schildklier werden toegevoegd.

In 3 van de 4 geopereerde dieren werd bij de obductie schildklierweefsel, zij het ook in slechts zeer geringe quantiteit, gevonden.

Slechts 1 van de 4 proeven geeft een concentratie-migratie-curve te zien zoals die bij gebruikmaking van materiaal van normale proefdieren optreedt. In de andere 3 proeven is er niet alleen bij de verdunning 1/130, doch ook bij de lagere verdunningen een sterke migratiebevordering, wat tot uiting komt in de in fig. 14 afgebeelde concentratie-migratie-curve.

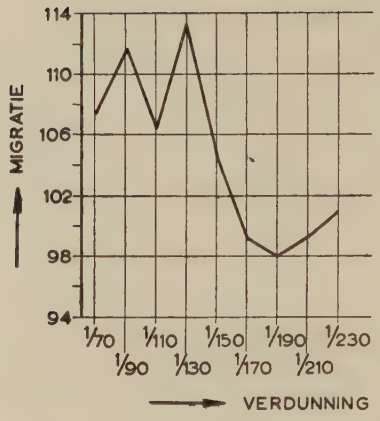


Fig. 14. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 110352; beenmerg van een schildklierloze cavia, bloedplasma van een normale cavia afkomstig. Schildklierfragmenten in vitro toegevoegd.

6. Een serie van 4 proeven met beenmergexplantaten afkomstig van een normale cavia, in een medium met plasma van een schildklierloze cavia, waarbij per cultuurbakje 5 stukjes vers schildklierweefsel werden toegevoegd.

In één proef werd in het halsweefsel van de plasmadonor een stukje schildklierweefsel met afmetingen van circa 1,2 × 0,5 × 0,9 mm gevonden. Deze proef, waarvan de concentratie-migratie-curve het typische verloop van een actief praeparaat toonde, werd daarom uit de serie verwijderd.

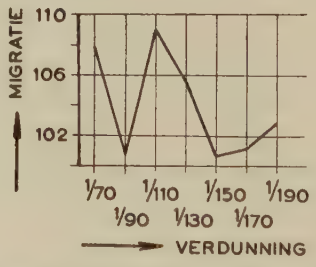


Fig. 15. Concentratie-migratie-curve van 3 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 110352; beenmerg van een normale cavia, bloedplasma van een schildklierloze cavia afkomstig. Schildklierfragmenten in vitro toegevoegd.

Van de 3 overblijvende proeven was er één die eveneens een dergelijke curve opleverde. Bij deze en bij één der overige proeven

voldeed de migratie niet aan de eerder door ons gestelde eis dat de gemiddelde waarde van de migratie-coëfficienten van de contrôle groter dan 40 moet zijn. Op grond hiervan kunnen uit de concentratie-migratie-curve van deze serie (fig. 15) geen gevolgtrekkingen worden gemaakt.

Discussie

a. *De series 1 - 3*

In deze experimenten werd dus onderzocht of de bevordering der migratie onder invloed van vitamine B_{12} onveranderd blijft wanneer:

1. het beenmergexplantaat en het bloedplasma voor het medium beide afkomstig zijn van schildklierloze caviae (serie 1), of
2. het beenmergexplantaat van een schildklierloze cavia, doch het bloedplasma voor het medium van een normale cavia afkomstig is (serie 2), of
3. het beenmergexplantaat van een normale cavia, het bloedplasma voor het medium evenwel van een schildklierloze cavia afkomstig is (serie 3).

De concentratie-migratie-curve van de eerste serie (fig. 10) toont enkele tamelijk sterke schommelingen, die voornamelijk worden teweeg gebracht door de uitkomsten van 1 der proeven; van de overige 2 experimenten uit deze serie heeft de curve een veel vlakker verloop. De curve van de 3 proeven gezamenlijk is geheel afwijkend van de normale concentratie-migratie-curve van het vitamine B_{12}. De migratiebevorderende werking die vitamine B_{12} in het toegepaste verdunningentraject uitoefent op beenmergexplantaten komt dus niet tot uiting wanneer zowel het beenmerg als het plasma waarin dit wordt geëxplanteerd afkomstig is van schildklierloze dieren.

Ook wanneer normaal plasma wordt gebruikt, en alleen het beenmerg van een schildklierloos dier wordt genomen (serie 2), blijft de normale migratiebevorderende activiteit van het vitamine B_{12} uit, zoals uit fig. 11 blijkt.

Het resultaat van de proeven waarbij beenmerg van normale caviae werd geëxplanteerd in plasma van schildklierloze dieren is

moeilijk te interpreteren. Het is echter wel evident dat er bij de optimale verdunning waarbij onder normale condities de migratie-stimulerende activiteit van dit vitamine B_{12}-praeparaat optreedt, geen bevordering van de migratie heeft plaats gevonden. De reactie wijkt dus ook onder deze omstandigheden van het normale af.

De thyreoidectomie van de proefdieren heeft in alle experimenten 6 tot 10 dagen voor het uitvoeren van de proef plaats gevonden. Men kan zich afvragen of de operatie als zodanig, of alleen de narcose, de oorzaak kan zijn van de waargenomen verschijnselen. De wijze waarop de narcose gegeven werd, n.l. met aether of nembutal, leek het resultaat niet te beïnvloeden. Bovendien werd in 3 experimenten waar 7 tot 10 dagen voor de uitvoering van de proef slechts een gedeelte van de schildklier werd weggenomen, een normale concentratie-migratie-curve van het vitamine B_{12} verkregen (fig. 16).

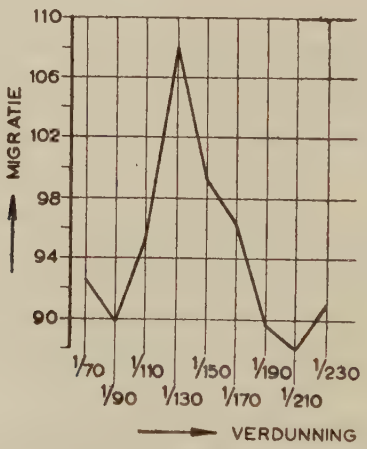


Fig. 16. Concentratie-migratie-curve van 3 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 110352; beenmerg en bloedplasma beide afkomstig van caviae waarbij een gedeelte van de schildklier was verwijderd.

Op grond hiervan menen wij dat de operatieve ingreep op zichzelf geen verandering in de reactie van het beenmerg op het vitamine B_{12} heeft veroorzaakt.

Evenmin kan ter verklaring worden aangevoerd dat de vitamine B_{12}-concentratie van het praeparaat zou zijn teruggelopen. Dit heeft gedurende de periode waarin deze series proeven werden

verricht steeds eenzelfde activiteit getoond. Dit blijkt o.a. uit de proeven waarbij de thyreoidectomie onvolledig was geweest, en waarbij toch een normale reactie optrad. Bovendien werd na voltooiing van de in dit hoofdstuk besproken experimenten het praeparaat 110352 nogmaals onder normale omstandigheden geijkt, waarbij bleek dat dit praeparaat nog steeds dezelfde migratiebevorderende activiteit bezat (fig. 17).

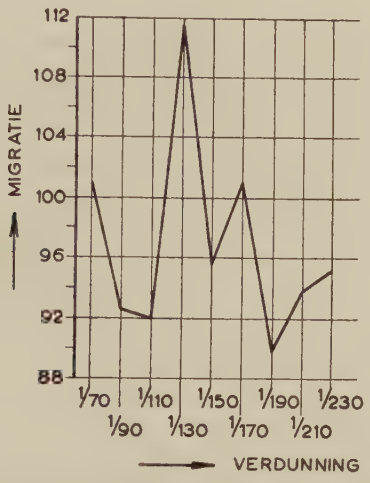


Fig. 17. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 110352, uitgevoerd na afloop van de series proeven met materiaal van schildklierloze caviae.

In de experimenten van de series 2 en 3 kon uit de aard der zaak het autologe bloedplasma, van de beenmergdonor, niet door het medium gemengd worden. Uit vroegere proeven was ons gebleken dat hierdoor geen verandering in de reactie optreedt. Bij de ijkingen van het leverextract Pernaemon Forte 421 H (zie hoofdstuk V) hebben wij ook een serie experimenten uitgevoerd waarbij het beenmerg werd geëxplanteerd in een medium dat uitsluitend plasma van een andere cavia bevatte. De daarbij verkregen concentratie-migratie-curve (fig. 18) kwam overeen met de curve die dit praeparaat onder standaard-omstandigheden had opgeleverd (zie fig. 1).

Het dient nog vermeld te worden dat het achterblijven van kleine fragmenten schildklierweefsel in de proefdieren onze resultaten niet bleek te beïnvloeden. Dit is niet verwonderlijk, daar het

hier weefselresten betreft die van hun normale samenhang met de omgeving zijn beroofd, en het tijdsverloop tussen de operatie en de uitvoering der proef te kort was voor een herstel van deze samenhang.

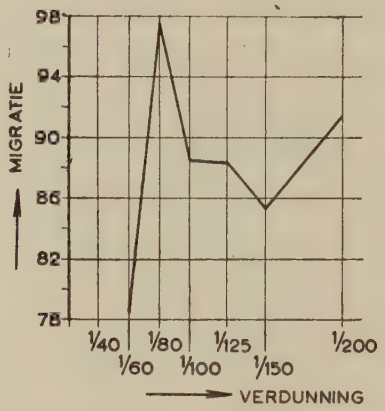


Fig. 18. Concentratie-migratie-curve van 4 proeven met Pernaemon Forte 421 H, waarbij geen autoloog bloedplasma werd gebruikt.

Uit deze series blijkt dus, dat voor de normale migratiebevorderende activiteit die het vitamine B_{12} uitoefent op explantaten van caviabeenmerg in een medium van verdund caviaplasma de aanwezigheid van de schildklier in de proefdieren, waarvan deze materialen worden genomen, noodzakelijk is.

b. *De series 4 - 6*

Hierna hebben wij onderzocht of het toevoegen van stukjes verse caviaschildklier in staat was het effect van de voorafgaande thyreoidectomie op te heffen, wanneer:

4. het beenmergexplantaat en het bloedplasma beide van schildklierloze caviae afkomstig waren (serie 4), of
5. alleen het beenmergexplantaat van een schildklierloze cavia afkomstig was, en het bloedplasma van een normale cavia (serie 5), of
6. het beenmergexplantaat van een normale cavia, doch het bloedplasma van een schildklierloze cavia afkomstig was (serie 6).

De resultaten van de experimenten van deze series zijn niet alle bevredigend. De concentratie-migratie-curve van de proeven waarbij alleen het beenmerg van schildklierloze dieren afkomstig was (serie 5) toont vanaf de verdunning 1/110 een normaal verloop (fig. 14); bij de lagere verdunningen echter is de migratie niet significant afwijkend van de migratie die bij de optimale verdunning optreedt, zodat wij deze curve niet durven interpreteren. Wel kan worden vermeld dat 1 van de 4 proeven een volkomen typische vitamine B_{12}-concentratie-migratie-curve opleverde.

De curve van serie 6 (fig. 15) lijkt op een herstel van de vitamine B_{12}-activiteit te wijzen, maar zij werd samengesteld uit 3 proeven waarvan er 2 een te geringe migratie toonden, zodat hieruit geen betrouwbare conclusies te trekken zijn.

In proefserie 4, waar beenmerg en plasma beide van schildklierloze caviae afkomstig waren, is het resultaat van de toevoeging van schildklierfragmenten in vitro wel tot uiting gekomen. In 3 van de 4 proeven van deze serie werd een normale concentratie-migratie-curve gevonden, behalve dat in 2 hiervan de top niet lag bij de optimale verdunning 1/130, doch bij de voorafgaande verdunning 1/110. Wij menen op grond van deze concentratie-migratie-curve (fig. 13) toch te mogen concluderen dat het mogelijk is de afwezigheid van de schildklier in de proefdieren te compenseren door het toevoegen van schildklierfragmenten in vitro.

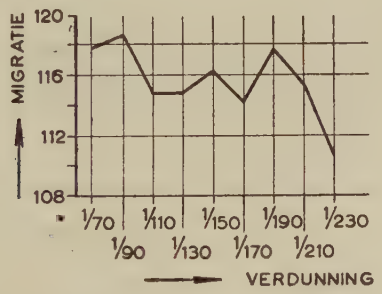


Fig. 19. Concentratie-migratie-curve van 2 proeven met vitamine B-12 praeparaat 110352; beenmerg en bloedplasma beide afkomstig van schildklierloze caviae. Fragmenten van de gl. submaxillaris in vitro toegevoegd.

Om na te gaan of hier inderdaad sprake is van een specifieke substitutie hebben wij nog een serie experimenten verricht waarbij

weer het beenmerg en het plasma beide van schildklierloze dieren werden gebruikt; in plaats van schildklierweefsel werd nu echter in 2 gevallen weefsel van de gl. submaxillaris en in 2 gevallen thymusweefsel in vitro toegevoegd. De concentratie-migratie-curves van het vitamine B_{12}-praeparaat 110352 in deze proeven zijn afgebeeld in fig. 19 en 20. Hieruit blijkt dat er geen migratiebevordering optreedt. De resultaten van deze experimenten duiden erop dat de toevoeging van schildklierfragmenten in vitro hier inderdaad een specifieke substitutie betekent.

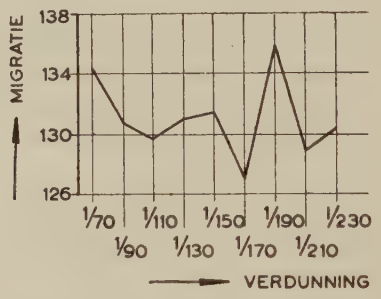


Fig. 20. Concentratie-migratie-curve van 2 proeven met vitamine B_{12}-praeparaat 110352; beenmerg en bloedplasma beide afkomstig van schildklierloze caviae. Thymusfragmenten in vitro toegevoegd.

Het lijkt dus waarschijnlijk dat de aanwezigheid van de schildklier bij de proefdieren, die nodig is voor het optreden van de migratiebevorderende werking van het vitamine B_{12}, kan worden vervangen door het toevoegen van schildklierfragmenten in vitro.

c. *De rol van de schildklier bij de migratiebevordering door vitamine* B_{12}

Waar het mechanisme van de migratiebevordering van granulocyten onder invloed van het vitamine B_{12} op zichzelf al niet duidelijk is, is het zeker niet goed mogelijk zich een oordeel te vormen over de wijze waarop de schildklier dit proces beïnvloedt.

In de litteratuur zijn weinig gegevens te vinden die hiervoor een aanwijzing zouden kunnen vormen. Door diverse onderzoekers is de invloed van thyroxine op cultures van fibroblasten na-

gegaan. Vogelaar c.s. (1936) zagen geen invloed van thyroxine op de groei van cultures van fibroblasten uit mensenschildklier. Bij kippenhartfibroblasten vonden Semura (1931), Latta c.s. (1938) en Haam c.s. (1940) dat thyroxine in lage verdunningen de groei remt, terwijl het in hogere verdunningen ($1 : 10^5$ - $1 : 10^7$) de groei bevordert. De laatstgenoemde auteurs vermeldden dat hierbij niet zozeer de oppervlakte van de groeizône dan wel het aantal mitosen wordt beïnvloed. Fell c.s. (1955) namen waar dat thyroxine de rijping van kraakbeen in gekweekte embryonale kippenextremiteiten bevordert.

Geen van deze processen is echter vergelijkbaar met het door ons waargenomen phaenomeen.

De belangwekkende experimenten van Nilzén (1955) kunnen aanleiding geven tot speculaties. Deze onderzoeker vond dat bij schildklierloze caviae (de gl. thyreoidea was onwerkzaam gemaakt met behulp van J^{131}) na injectie van ei-albumine geen vorming van praecipitine aantoonbaar was. De aanwezigheid van een zwak positieve Schultz-Dale-reactie in deze dieren deed hem vermoeden dat onder deze omstandigheden wel antilichamen gevormd werden, doch dat de reactie met het substraat uitbleef. Indien dit vermoeden juist is zou het belangwekkend zijn om na te gaan of de op pag. 41 vermelde vondst, dat toevoeging van praecipitine aan een medium waarin zich granulocyten bevinden, in bepaalde concentraties een migratiebevorderende werking uitoefent (Meier c.s. 1955), ook door de schildklier wordt beïnvloed. Indien dit inderdaad het geval zou zijn, dan zou de hypothese dat de migratiebevordering door het vitamine B_{12} in bepaalde concentraties op een structuurverandering van het coagulum berust, zie pag. 41) aan waarschijnlijkheid winnen.

Een nader onderzoek in deze richting kan stellig belangwekkende resultaten opleveren.

Conclusie

1. Voor het tot stand komen van de normale migratiebevorderende werking van het vitamine B_{12} op explantaten van caviabeenmerg is de aanwezigheid van de schildklier vereist, zowel in het proefdier waarvan het beenmerg wordt genomen als in het proefdier dat het bloedplasma voor het medium levert.

2. Er zijn aanwijzingen dat het mogelijk is om de afwezigheid van de schildklier in de proefdieren, waarvan het materiaal wordt gebruikt, te compenseren door verse schildklierfragmenten aan het medium toe te voegen.

3. Het is niet mogelijk, met de beschikbare gegevens, een verband te leggen tussen de resultaten van onze experimenten en de bloedvorming.

SAMENVATTING

Uit de litteratuur blijkt dat thans vrijwel vast staat dat het ziektebeeld der pernicieuze anaemie wordt veroorzaakt door een voorwaardelijke deficiëntie aan vitamine B_{12}. De oorzaak hiervan ligt in het onvermogen van het maagslijmvlies om de „intrinsic factor" te vormen. Bij afwezigheid van deze factor is het organisme niet in staat voldoende te resorberen van de in een normale voeding voorkomende hoeveelheid vitamine B_{12}.

Van dit laatste is de chemische structuur bekend geworden; over de wijze waarop het zijn functie bij het normale verloop der erythropoiese en bij de werkzaamheid van het zenuwstelsel vervult zijn nog slechts verspreide aanwijzingen verkregen.

Het verband dat in sommige klinische overzichten wordt gelegd tussen de aanwezigheid van schildklierafwijkingen en pernicieuze anaemie is evenmin opgehelderd.

Door Overbeek, Gaillard en de Jongh was, voordat het vitamine B_{12} uit anti-anaemisch leverextract was geïsoleerd, de invloed van deze leverpraeparaten op explantaten van caviabeenmerg bestudeerd. Zij vonden daarbij, dat leverextract in bepaalde verdunningen een duidelijke bevordering van de migratie van granulocyten uit deze beenmergfragmenten veroorzaakte, wanneer deze waren geëxplanteerd in een medium van verdund caviaplasma. Met behulp hiervan konden zij een ijkingsmethode voor anti-anaemische leverpraeparaten ontwerpen. Uit hun experimenten kregen zij de indruk dat deze migratiebevordering niet optrad wanneer het beenmerg of het bloedplasma afkomstig was van schildklierloze caviae.

Ons onderzoek had tot doel na te gaan of de migratiebevorderende werking, die anti-anaemische leverextracten uitoefenen op explantaten van caviabeenmerg, ook optreedt wanneer de schildklier is verwijderd bij het proefdier waarvan het beenmerg wordt

geëxplanteerd en/of het proefdier waarvan het bloedplasma wordt gebruikt voor de samenstelling van het medium. Wanneer dit niet het geval zou zijn dan wilden wij onderzoeken of door het toevoegen van schildklierfragmenten in vitro de normale reactie hersteld zou kunnen worden.

Voordat wij hiertoe overgingen hebben wij eerst een onderzoek ingesteld naar de vraag of de migratiebevorderende werking van anti-anaemische leverextracten wordt veroorzaakt door het vitamine B_{12}. Hiertoe hebben wij, nadat wij eerst een commercieel anti-anaemisch leverpraeparaat als standaard hadden geijkt, verschillende vitamine B_{12}-praeparaten op hun migratiebevorderende werking onderzocht. Daarbij bleek dat het vitamine B_{12} inderdaad in deze proefopstelling eenzelfde activiteit toont als het anti-anaemische leverextract. Wij vonden geen reden om aan te nemen dat zich in dit laatste, naast het vitamine B_{12}, nog een of meer andere factoren bevinden die eveneens de migratie van granulocyten uit explantaten van caviabeenmerg bevorderen.

Vervolgens hebben wij met behulp van twee oplossingen van kristallijn vitamine B_{12}, waarvan het gehalte microbiologisch was bepaald, de invloed van de schildklier op de bevordering der migratie onderzocht. Uit de resultaten bleek dat voor het optreden van de normale reactie noodzakelijk is dat zowel bij de cavia waarvan het beenmerg wordt geëxplanteerd als bij de cavia waarvan het bloedplasma in het medium wordt gebruikt de schildklier aanwezig is.

Onze pogingen om de aanwezigheid van de schildklier in de proefdieren te substitueren door het toevoegen van schildklierfragmenten in vitro leverden niet geheel bevredigende resultaten op. Wij verkregen daarbij wel aanwijzingen dat deze substitutie inderdaad mogelijk is.

Over het mechanisme van de migratiebevordering onder invloed van vitamine B_{12}, en over de betekenis van de schildklier voor deze reactie, is nog geen oordeel mogelijk.

LITTERATUURLIJST

Addison T. (1855). On the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules. London. Geciteerd naar Whitby (1955).

Andresen J. G. (1954). A clinically active vitamin B_{12} protein complex. Acta pharmacol. (Kbh). 10, p. 241.

Armbrust K. E. en H. D. Bett. (1946). Response of bone marrow explants to liver extract preparations. J. Pharmacol. 88, p. 382.

Armbrust K. E. en H. D. Bett. (1949). The effect of liver extract preparation on bone marrow explants. Canad. J. Research, E. 27/5.

Astaldi G., M. Baldini en C. Frugoni Jr. (1948). Transformatione normoblastica del midullo osseo dell'anaemia perniciosa ottenuta in vitro per azione diretta dell'estratto epatico. Haematologica 31, p. 265.

Axelrod A. R. en L. Berman. (1950 a). The blood and bone marrow in hypo- and hyperthyroidism. Proc. 3rd internat. congress Internat. Soc. Haematol., p. 78.

Axelrod A. R. en L. Berman. (1950 b). Observations on the relationship between bone-marrow activity and thyroid function. J. Lab. clin. Med. 36, p. 797.

Badenoch J., S. T. Callender, J. R. Evans, A. L. Turnbull en L. J. Witts. (1955). Megaloblastic anaemia of pregnancy and the puerperium. Brit. med. J. 1, p. 1245.

Baker S. J. en D. L. Mollin. (1955). The relationship between intrinsic factor and the intestinal absorption of vitamin B_{12}. Brit. J. Haematol. 1, p. 46.

Bán A. (1954). Klinische Erfahrungen über 141 Perniciosakranke seit 1945. Dtsch. Arch. klin. Med. 201, p. 661.

Beard M. F. en W. R. Ritney. (1954). Abnormalities of serum vitamin B_{12} concentrations in leukaemia. Rev. Hémat. 9, p. 468.

Berk L., W. B. Castle, A. D. Welch, R. W. Heinle, R. Anker en M. Epstein. (1948). Activity of vitamin B_{12} as food (extrinsic) factor. New Engl. J. Med. 239, p. 911.

Bert P. (1882). Sur la richesse en hémoglobine du sang des animaux vivant sur les haut lieux. C. R. Acad. Sci. (Paris) 94, p. 805.

Betheil J. J. en H. A. Lardy. (1948). Comparative effectiveness of vitamin B_{12}, whole liver substance and extracts high in A P A activity, as growth promoting materials for hyperthyroid animals. J. Nutr. 37, p. 495.

Bethell F. H., M. C. Meyers en R. B. Neligh. (1948). Vitamin B_{12} in pernicious anemia and puerperal macrocytic anemia. J. Lab. clin. Med. 33, p. 1477.

Bethell F. H., M. E. Swenseid, S. Miller en A. A. Citron-Rivera. (1951). Cobalamin (vitamin B_{12}) and the intrinsic factor of Castle. Ann. intern. Med. 35, p. 518.

Biermer A. (1872). Korresp. Bl. Schweiz. Ärz. 2, p. 15. Geciteerd naar Minot c.s. (1925).

Blackburn E. K., J. Burke, C. Roseman en E. J. Wayne. (1952). Comparison of liver extract and vitamin B_{12} (cyanocobalamin) in maintenance treatment of pernicious anaemia. Brit. med. J. 2, p. 245.

Blackburn E. K., H. Cohen en G. M. Wilson. (1955). Oral treatment of pernicious anaemia with a combined vitamin B_{12} and intrinsic factor preparation. Brit. med. J. 2, p. 461.

Bolene C., O. B. Ross en R. MacVicar. (1950). The growth-promoting action of various supplements in the hyperthyroid rat. Proc. Soc. exp. Biol. 75, p. 610.

Bonnett R., J. R. Cannon, A. W. Johnson, I. Sutherland, A. R. Todd en E. L. Smith. (1955). The structure of vitamin B_{12} and its hexacarboxylic acid degradation product. Nature 176, p. 328.

Bonsdorff E. en E. Jalavisto. (1948). A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. Acta physiol. scand. 16, p. 150.

Borsook H., A. Graybril, G. Keighler en E. Windsor. (1954). Polycythemic response in normal adult rats to a non protein plasma extract from anemic rabbits. Blood 9, p. 734.

Bradley J. E., E. L. Smith, S. J. Baker en D. L. Mollin. (1954). The use of the radioactive isotope of cobalt (Co^{58}) for the preparation of labelled vitamin B_{12}. Lancet 2, p. 476.

Burkholder P. R. (1951 a). Determination of vitamin B_{12} with a mutant strain of Escherichia coli. Science 114, p. 459.

Burkholder P. R. (1951 b). Microbiological studies on the intrinsic factor of Castle. Science 114, p. 478.

Burkholder P. R. (1952). Microbiological studies on materials which potentiate oral vitamin B_{12} therapy in Addisonian anaemia. Arch. Biochem. Biophys. 39, p. 322.

Callender S. T., A. Turnbull en G. Wakisaka. (1954). Estimation of intrinsic factor of Castle by use of radioactive vitamin B_{12}. Brit. med. J. 1, p. 10.

Callender S. T. en J. R. Evans. (1955). The urinary excretion of labelled vitamin B_{12}. Clin. Sci. 14, p. 295.

Cameron D. G., S. R. Townsend en E. S. Mills. (1951). Pernicious anemia. I. Maintenance treatment with liver extract. Canad. med. Ass. J. 65, p. 241.

Cameron D. G., S. R. Townsend en A. English. (1954). Pernicious anemia. II. Maintenance treatment with crystalline vitamin B_{12}. Canad. med. Ass. J. 70, p. 398.

Carnot P. en C. Deflandre. (1906). Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régéneration du sang. C.R. Acad. Sci. (Paris) 143, p. 348.

Castle W. B. (1929 a). Effects of the administration to patients with pernicious anemia of the contents of the normal human stomach recovered after the ingestion of beef muscle. Amer. J. med. Sci. 178, p. 748.

Castle W. B. en W. C. Townsend. (1929 b). Effect of administration to patients with pernicious anemia of beef muscle after incubation with normal human gastric juice. Amer. J. med. Sci. 178, p. 764.

Castle W. B., W. C. Townsend en C. W. Heath. (1930). Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anemia. III. The nature of the reaction between normal human gastric juice and beef muscle leading to clinical improvement and increased blood formation similar to the effect of liver feeding. Amer. J. med. Sci. 180, p. 305.

Castle W. B. en T. H. Ham. (1936). Further evidence for essential participation of extrinsic factor in hematopoietic responses to mixtures of beef muscle and gastric juice and to hog stomach mucosa. J. Amer. med. Ass. 107, p. 1456.

Chaiet L., C. Rosenblum en D. T. Woodbury. (1950). Biosynthesis of radioactice vitamin B_{12} containing cobalt 60. Science 111, p. 601.

Chalmers J. N. M. en Z. M. Hall. (1954). Treatment of pernicious anemia with oral vitamin B_{12} without known source of intrinsic factor. Brit. med. J. 1, p. 1179.

Cohn E. J., G. R. Minot, G. A. Allis en W. T. Salter. (1928). Nature of material in liver effective in pernicious anemia. J.biol. Chem. 77, p. 325.

Conley C. L., T. W. Green, R. C. Hartmann en J. R. Krevans. (1952). Prolonged treatment of pernicious anemia with vitamin B_{12}. Amer. J. Med. 13, p. 284.

Conley C. L. (1953). Vitamin B_{12} conference. Science 118, p. 582.

Davidson L. S. P. (1928). The gastro-intestinal flora in pernicious anemia. J. Path. Bact. 31, p. 577.

Davis B. D. en E. S. Mingioli. (1950). Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bact. 60, p. 17.

Dinning J. S., L. D. Payne en P. L. Day. (1952). Influence of dimethylaminoazobenzene on leukocyte production in the rat. Blood 7, p. 376.

Doctor V. M., B. E. Welch, R. W. Perrett, C. L. Brown, S. Gabay en J. R. Couch. (1953). Metabolic interrelationship between folic acid, vitamin B_{12} and the citrovorum factor. Proc. Soc. exp. Biol. 84, p. 29.

Dominicis N. de. (1895). Wiener med. Wschr. Geciteerd naar Mansfeld (1943).

Emerson G. A. (1949). Growth promoting activity of vitamin B_{12} in rats receiving thyroid substance. Proc. Soc. exp. Biol. 70, p. 392.

Erslev A. J. (1953 a). Humoral regulation of red cell production. Blood 8, p. 349.

Erslev A. J., P. H. Lavietes en G. van Wagenen. (1953 b). Erythropoietic stimulation induced by "anemic" serum. Proc. Soc. exp. Biol. 83, p. 548.

Everse J. W. R. en H. J. Wijmenga. (1954). The clinical activity of the intrinsic factor, and the vitamin B_{12} binding capacity. Acta haemat. (Basel) 11, p. 62.

Fatterpaker P., U. Marfatia en A. Sreenivasan. (1955). Protective action of vitamin B_{12} in the hyperthyroid rat. Nature 176, p. 165.

Feinmann E. L., J. Sharp en J. F. Wilkinson. (1952). Observations on the behaviour of erythroblasts cultured in normal and pernicious anaemia sera. Brit. med. J. 2, p. 14.

Fell H. B. en E. Mellanby. (1955). The biological action of thyroxine on embryonic bones grown in tissue culture. J. Physiol. (Lond.) 127, p. 427.

Fenwick S. (1877). On atrophy of the stomach in relation to pernicious anaemia. Lancet 2, p. 77.

Flood F. T. en L. R. Limarzi. (1950). Follow-up study of 310 cases of pernicious anemia. J. Lab. clin. Med. 36, p. 823.

Franco J. en S. N. Arkun. (1951). L'action de l'acide 4-aminoptéroylglutamique (aminoptérine) in vitro sur une culture de moelle d'anémie pernicieuse. Sang 22, p. 413.

Frost D. V., H. H. Fricke en H. C. Spruth. (1949). Rat growth assay for vitamin B_{12}. Proc. Soc. exp. Biol. 72, p. 102.

Gaillard P. J., G. A. Overbeek en H. Y. Tan. (1940). Action of antianemic preparations on bone marrow in vitro. Arch. int. Pharmacodyn. 44, p. 33.

Gardner F. H., J. W. Harris, R. F. Schilling en W. B. Castle. (1949). Hematopoietic activity in pernicious anemia of a beef muscle extract containing food (extrinsic) factor upon intravenous injection without contact with gastric (intrinsic) factor. J. Lab. clin. Med. 34, p. 1502.

Girdwood R. H. (1950). Vitamin B_{12} and related factors. A clinical and experimental review. Edinb. med. J. 57, p. 72.

Girdwood R. H. (1951). Treatment of pernicious anaemia with leukonostoc citrovorum factor. Lancet 1, 722.

Girdwood R. H. (1952). The interrelationships of factors that influence the megaloblastic anemias. Blood 7, p. 77.

Glass G. B. J. en L. J. Boyd. (1953). Oral treatment of pernicious anemia with small doses of vitamin B_{12} combined with mucinous materials derived from the hog stomach. Blood 8, p. 867.

Glass G. B. J., L. J. Boyd en L. Stephanson. (1954). Intestinal absorption of vitamin B_{12} in humans as studied by isotope technic. Proc. Soc. exp. Biol. 86, p. 522.

Glass G. B. J., L. J. Boyd, A. L. Luhby en L. Stephanson. (1955). Assay of intrinsic factor preparations: comparison of the hepatic uptake of radioactive Co^{60}-B_{12} with the hematopoietic response in pernicious anemia. J. Lab. clin. Med. 46, p. 60.

Gordon A. S., S. J. Piliero, W. Kleinberg en H. H. Freedman. (1954). A plasma extract with erythropoietic activity. Proc. Soc. exp. Biol. 86, p. 255.

Gottlebe P. (1936). Die experimentellen Anämiën und ihre Eignung als Test für antianämische Stoffe; die Collargol-Saponinanämie des Kaninchens als quantitativer Test für injizierbare Leberextrakte. Arch. exp. Path. 181, p. 317.

Gregory M. E. (1954). The microbiological assay of vitamin B_{12} in the milk of different animal species. Brit. J. Nutr. 8, p. 340.

Grunbaum B. W., F. L. Schaffer en P. L. Kirk. (1955). Lipids of chick heart fibroblasts; effect of vitamin B_{12} and folic acid. Proc. Soc. exp. Biol. 88, p. 459.

Haam E. van en L. Cappel. (1940). Effect of hormones upon cells grown in vitro. II. The effect of the hormones from the thyroid, pancreas and adrenal gland. Amer. J. Cancer 39, p. 354.

Hall B. E. en D. C. Campbell. (1948). Vitamin B_{12} therapy in pernicious anemia. I: Effect on hematopoietic system. Proc. Mayo Clin. 23, p. 584.

Hall B. E., E. H. Morgan en D. C. Campbell. (1949). Oral administration of vitamin B_{12} in pernicious anemia. I. Presence of intrinsic factor in Berkefeld-filtered pooled human gastric juice. Proc. Mayo Clin. 24, p. 99.

Hamilton L. D., S. H. Hutner en L. Provasoli. (1952). The use of protozoa in analysis. Analyst 77, p. 618.

Harris P. F., V. Menkin en J. M. Yoffey. (1956). The action of leukocytosis-promoting factor on the blood and bone marrow of the guinea pig. Blood 11, p. 243.

Hausmann K. en K. Mulli. (1952). On the hematopoietic effect of vitamin B_{12} and vitamin B_{12} peptid-conjugates. Acta haemat. (Basel) 8, p. 345.

Hausmann K., L. Ludwig en K. Mulli. (1954). Die bakterielle Zerstörung des Vitamin B_{12} bei perniciöser Anämie. Acta haemat. (Basel) 11, p. 223.

Heinle R. W., A. D. Welch, V. Scharf, G. C. Meacham en W. H. Prusoff. (1952). Studies of excretion (and absorption) of Co^{60} labelled vitamin B_{12} in pernicious anemia. Trans. Ass. Amer. Phys. 65, p. 214.

Hodgkin D. C., J. Pickworth, J. Robertson, K. N. Trueblood, R. J. Prosen en J. G. White. (1955). The crystal structure of the hexacarboxylic acid derived from B_{12} and the molecular structure of the vitamin. Nature 176, p. 325.

Hodgkin D. C., J. Kamper, M. Mackay, J. Pickworth, K. N. Trueblood en J. G. White. (1956). Structure of vitamin B_{12}. Nature 178, p. 64.

Hoff-Jørgensen. (1952). The effect of "intrinsic factor" on the absorption of vitamin B_{12} by wild type of Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys. 36, p. 235.

Hoffmann C. E., E. L. R. Stokstad, A. L. Franklin en T. H. Jukes. (1948). Response of Lactobacillus leichmannii 313 to anti pernicious anemia factor. J. biol. Chem. 176, p. 1465.

Horrigan D. en R. W. Vilter. (1950). Direct action of vitamin B_{12} upon human bone marrow; the effect of instillation of vitamin B_{12} and folic acid into the bone marrow as studied by histochemical techniques. J. clin. Invest. 29, p. 823.

Horrigan D. L. en R. W. Heinle. (1952). Role of tissue binding in local erythroid maturation following instillation of vitamin B_{12} into marrow cavity J. clin. Invest. 31, p. 639.

Hunter W. (1901). Pernicious anaemia: its pathology, septic origin, symptoms, diagnosis and treatment. London. Geciteerd naar Whitby. (1955).

Hurst A. F. (1922). The pathogenesis of subacute combined degeneration of the spinal cord. Brain 45, p. 266.

Hutner S. H., L. Provasoli, E. L. R. Stokstad, C. E. Hoffmann, M. Belt, A. L. Franklin en T. H. Jukes. (1949). Assay of anti-pernicious anemia factor with Euglena. Proc. Soc. exp. Biol. 70, p. 118.

Hyland H. H., G. O. Watts en R. F. Farquharson. (1951). The course of subacute combined degeneration of the spinal cord. Canad. med. Ass. J. 65, p. 295.

Israels M. C. G. en J. F. Wilkinson. (1949). Risk of neurological complications in pernicious anaemia treated with folic acid. Brit. med. J. 2, p. 1072.

Jacobson B. M. en R. C. Bishop. (1949). Studies of the principle in liver effective in pernicious anemia. VII. The augmentative effect of accessory factors on the therapeutic activity of vitamin B_{12}. J. clin. Invest. 28, p. 791.

Jaffé W. G. (1950). Reproduction of mice kept on rations low in vitamin B_{12}. Arch. Biochem. 27, p. 464.

Jongh S. E. de (1939). Recente onderzoekingen over de werking van anti-anaemische leverpreparaten. Hormoon. 9, p. 64.

Jürgens R. en A. Studer. (1951). Experimental leukopenia in rats and their therapeutic response to vitamins, metals and other substances. Acta haemat. (Basel) 5, p. 47.

Kunde M. M., M. F. Green en G. Burns. (1931). Blood changes in experimental hypo- and hyperthyroidism (rabbit). Amer. J. Physiol. 99, p. 469.

Lajtha L. G. (1950). An inhibitory factor in pernicious anaemia serum. Clin. Sci. 9, p. 287.

Lajtha L. G. (1952). Culture of human bone marrow in vitro. The reversibility between normoblastic and megaloblastic series of cells. J. clin. Path. 5, p. 67.

Latner A. L., C. C. Ungley, E. V. Cox, E. McEvoy-Bowe en L. Raine. (1953). Electrophoresis of human gastric juice in relation to Castle's intrinsic factor. Brit. med. J. 1, p. 467.

Latta J. S. en J. Z. Davis. (1938). The effects of thyroxin in varying concentrations on the growth of fibroblasts in vitro. Arch. exp. Zellforsch. 21, p. 427.

Lichtman H., J. Watson, V. Ginsberg, J. V. Pierce, E. L. R. Stokstad en T. H. Jukes. (1949). Vitamin B_{12}b: some properties and its therapeutic use. Proc. Soc. exp. Biol. 72, p. 643.

Lichtman H., V. Ginsberg en J. Watson. (1950). Therapeutic effect of aureomycin in pernicious anemia. Proc. Soc. exp. Biol. 74, p. 884.

Linman J. W. en F. H. Bethell. (1956). The plasma erythropoietic stimulating factor. Observations on circulating erythrocytes and bone marrow of rats receiving protein free extracts of rabbit plasma. Blood 11, p. 310.

Mansfeld G. en J. Sos. (1938). Über die Beziehungen der Schilddrüse zur perniziösen Anämie. Klin. Wschr. 17, p. 386.

Mansfeld G. (1943). Die Hormone der Schilddrüse und ihre Wirkungen. (Basel).

Meacham G. C., P. J. Vignos, R. W. Heinle, A. S. Weisberger en M. Epstein. (1950). Vitamin B_{12} concentrate in maintenance of pernicious anemia. J. Lab. clin. Med. 35, p. 713.

Meacham G. C. en R. W. Heinle. (1953). Maintenance therapy of pernicious anemia with vitamin B_{12}. J. Lab. clin. Med. 41, p. 65.

Meier R. en B. Schär. (1955). Leukocytenemigrationsförderung durch Antigen-Antikörper-Reaktion in vitro. Experientia (Basel) 11, p. 395.

Menkin V. (1940). Mechanism of leukocytosis with inflammation. Arch. Path. (Chicago) 30, p. 363.

Menkin V. en M. A. Kadish. (1942 a). Presence of the leukocytosis promoting factor in the circulating blood. Arch. Path. (Chicago) 33, p. 193.

Menkin V., M. A. Kadish en S. C. Sommers. (1942 b). Leukocytosis-promoting factor in inflammatory exudates of man. Arch. Path. 33, p. 188.

Menkin V. (1943). The effect of the leukocytosis promoting factor on the growth of cells in the bone marrow. Amer. J. Path. 19, p. 1021.

Meulengracht E. (1929). Morbus Basedowii und Perniciöse Anaemie. Klin. Wschr. 8, p. 18.

Meyer L. M., A. Sawitsky, N. D. Ritz en C. Brahin. (1953). Treatment of pernicious anemia with crystalline vitamin B_{12}b. Blood 8, p. 358.

Meyer L. M. (1953). Oral administration of Co^{60} vitamin B_{12} in pernicious anemia. Proc. Soc. exp. Biol. 82, p. 490.

Minot G. R. en W. P. Murphy. (1926). Treatment of pernicious anemia by a special diet. J. Amer. med. Ass. 87, p. 470.

Moench L. M., M. C. Kahn en J. C. Torrey. (1925). Analysis of the fecal flora in 33 cases of pernicious anemia. J. infect. Dis. 37, p. 161.

Mollin D. L. en J. V. Dacie. (1950). Observations on the relationship between the red cell and reticulocyte responses and changes in the bone-marrow of patients suffering from pernicious anaemia treated with injections of liver extracts or vitamin B_{12}. Proc. roy. Soc. Med. 43, p. 541.

Mollin D. L. en G. I. Ross. (1955). Serum vitamin B_{12} concentrations in leukaemia and in some other haematological conditions. Brit. J. Haemat. 1, p. 155.

Morgan E. H., B. E. Hall en D. C. Campbell. (1949). Hematopoietic activity of parenterally administered beef muscle concentrate in cases of pernicious anemia. Proc. Mayo Clin. 24, p. 594.

Mueller J. F. en J. J. Will. (1955). Interrelationship of folic acid, vitamin B_{12} and ascorbic acid in patients with megaloblastic anemia. Amer. J. clin. Nutr. 3, p. 30.

Mulder H. P. en W. J. Mulder. (1947). Grave's disease and Addisonian pernicious anemia. Acta med. scand. 127, p. 218.

Müller P. T. (1912). Über die Wirkung des Blutserums anaemischer Tiere. Arch. Hyg. (Berlin) 75, p. 290.

Nichol C. A., L. S. Dietrich, W. W. Cravens en C. A. Elvehjem. (1949). Activity of vitamin B_{12} in the growth of chicks. Proc. Soc. exp. Biol. 70, p. 40.

Nieweg H. O. (1953). Vitamine B_{12}- en foliumzuurdeficiëntie. Proefschrift, Groningen.

Nieweg H. O., A. Arends, E. Mandema en W. B. Castle. (1956). Enhanced absorption of vitamin B_{12} in gastrectomized rat by rat intrinsic factor. Proc. Soc. exp. Biol. 91, p. 328.

Nilzén A. (1955 a). The influence of the thyroid gland on hypersensitivity reactions in animals. II. The influence of thyroidectomy on experimental encephalitis in guinea pigs. Acta allerg. (Kbh) 8, p. 57.

Nilzén A. (1955 b). The influence of the thyroid gland on hypersensitivity reactions in animals. III. The influence of thyroidectomy on the precipitin reaction, the Arthus phenomenon and the Schultz-Dale reaction in guinea pigs. Acta allerg. (Kbh) 8, p. 103.

Oliva G., F. Chiuini en C. Tramontana. (1949). On the humoral regulation of the normoerythropoiesis. Acta med. scand. 133, p. 27.

Oliver T. H. en J. F. Wilkinson. (1933). Achlorhydria. Quart. J. Med. 2, p. 431.

Osgood E. E. en I. Brownlee. (1937). Culture of human marrow. J. Amer. med. Ass. 108, p. 1793.

Ott W. H., E. L. Rickes en T. R. Wood. (1948). Activity of crystalline vitamin B_{12} for chick growth. J. biol. Chem. 174, p. 1047.

Overbeek G. A., P. J. Gaillard en S. E. de Jongh. (1938). Ein qualitatives und quantitatives Testverfahren für die Wirkung antianämischer Leberextrakte in vitro. Schweiz. med. Wschr. 68, p. 711.

Overbeek G. A. en P. J. Gaillard. (1942). Action of antianemic preparations on bone marrow in vitro II. Arch. int. Pharmacodyn. 47, p. 276.

Pace N. en R. S. Fisher. (1942). Assay of anti-pernicious liver concentrates by the use of an isolated bone marrow preparation. J. Pharmacol. 74, p. 256.

Perri G. C., E. Borghese en L. Gelmetti. (1951). Azione dell'estrato epatico e dell'acido folico sui megaloblasti embrionali di pollo coltivati in vitro. La grandezza cellulare. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 27, p. 556.

Pfiffner J. J., H. W. Dion en D. G. Calkins. (1952). Further caracterization of pseudovitamin B_{12} pigments. Fed. Proc. 11, p. 269.

Piliero S. J., P. T. Medici, B. Pansky, A. L. Luhby en A. S. Gordon. (1956). Erythropoietic stimulating effects of plasma extracts from anemic human subjects. Proc. Soc. exp. Biol. 93, p. 302.

Pitney W. R. en M. F. Beard. (1954). Observations on the vitamin B_{12} binding proteins of serum and tissues. Rev. Hémat. 9, p. 555.

Prinzie A. (1951). Recherches sur la méchanisme d'action de l'effet anti-thyrotoxique de la vitamine B_{12}. Ann. Endocr. (Paris) 12, p. 250.

Prusoff W. H., A. D. Welch, R. W. Heinle en G. C. Meacham. (1953). Concentration of intrinsic factor and vitamin B_{12} binding activities of fractions of desiccated hog stomach. Blood 8, p. 491.

Rabbi A., M. Marchetti en R. Viviani. (1954). Ipertiroidismo sperimentale e vitamina B_{12} nel fegato di ratto. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 30, p. 442.

Reisner Jr E. J. en H. T. Swan. (1953). Effect of vitamin B_{12} and intrinsic factor on maturation of megaloblasts in tissue culture. J. Lab. clin. Med. 42, p. 934.

Reissmann K. R. (1950). Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. Blood 5, p. 372.

Rickes E. L., N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood en K. Folkers. (1948 a). Crystalline vitamin B_{12}. Science 107, p. 396.

Rickes E. L., N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood en K. Folkers. (1948 b). Vitamin B_{12}, a cobalt complex. Science 108, p. 134.

Rosenblum C., D. T. Woodbury, J. P. Gilbert, K. Okuda en B. F. Chow. (1955). Comparative absorption of vitamin B_{12} analogues by normal humans. I. Chlorocobalamin vs cyanocobalamin. Proc. Soc. exp. Biol. 89, p. 63.

Ross J. F., H. W. Belding en B. L. Paegel. (1948). The development and progression of subacute combined degeneration of the spinal cord in patients with pernicious anemia treated with synthetic pteroylglutamic (folic) acid. Blood 3, p. 68.

Ross, G. I. M. (1950). Vitamin B_{12} assay in body fluids. Nature 166, p. 270.

Ross G. I. M. (1952). Vitamin B_{12} assay in body fluids using Euglena gracilis. J. clin. Path. 5, p. 250.

Rupp J., K. E. Paschkis en A. Cantarow. (1951). Influence of vitamin B_{12} and liver extract on the nitrogen balance of normal and hyperthyroid rats. Proc. Soc. exp. Biol. 76, p. 432.

Rusznyák S., S. Löwinger en L. Lajtha. (1947). Maturation of megaloblasts in bone marrow cultures. Nature 160, p. 757.

Schilling R. F., J. W. Harris en W. B. Castle. (1951). Hematopoietic activity of vitamin B_{12}a (vitamin B_{12}b). Blood 6, p. 228.

Schilling R. F. (1953). Intrinsic factor studies. II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the oral administration of radioactive vitamin B_{12}. J. Lab. clin. Med. 42, p. 860.

Schilling R. F., D. V. Clatanoff en D. R. Korst. (1955). Intrinsic factor studies. III. Further observations utilizing the urinary ralioactivity test in subjects with achlorhydria, pernicious anemia, or a total gastrectomy. J. Lab. clin. Med. 45, p. 926.

Schmid R. en A. S. Gilbertsen. (1955). Fundamental observations on the production of compensatory polycythemia in a case of patent ductus arteriosis with reversed blood flow. Blood 10, p. 247.

Seip M. (1955). Humoral factors in regulation of reticulocyte level and erythropoiesis in man. Acta paediat. (Uppsala) 44, p. 507.

Semura S. (1931). Über den Einflusz des Antuitrins und des Thyroxins auf das Wachstum der in vitro-Kulturen von Fibroblasten. Arch. exp. Zellforsch. 10, p. 329.

Sharpe J. C. en J. D. Bisgard. (1936). Relation of thyroid gland to hematopoiesis; experimental total thyroidectomy in rabbit. J. Lab. clin. Med. 21, p. 347.

Shorb M. S. (1947). Unidentified growth factors for Lactobacillus lactis in refined liver extracts. J. biol. Chem. 169, p. 455.

Skeggs H. R., J. W. Huff, L. D. Wright en D. K. Bosshardt. (1948). The use of Lactobacillus leichmannii in the microbiological assay of the "animal protein factor". J. biol. Chem. 176, p. 1459.

Smith E. L. (1948 a). Purification of anti-pernicious anaemia factor from liver. Nature 161, p. 638.

Smith E. L. (1948 b). Presence of cobalt in the anti-pernicious anaemia factor. Nature 162, p. 144.

Smith E. L. (1949). Crystalline anti-pernicious anaemia factor. Brit. med. J. 2, p. 1368.

Spies T. D. (1946). Effect of folic acid on persons with macrocytic anemia in relapse. J. Amer. med. Ass. 30, p. 474.

Spies T. D., R. M. Suarez, G. G. Lopez, F. Milanes, R. E. Stone, R. L. Toca, T. Aramburu en S. Kartus. (1949). Tentative appraisal of vitamin B_{12} as a therapeutic agent. J. Amer. med. Ass. 139, p. 521.

Spies T. D., R. E. Stone, M. B. Koch, H. M. Grant en M. M. Moore. (1950). Hematopoietic response of patients with pernicious anemia to crystalline vitamin B_{12}b. Sth. med. J. (Bgham, Ala.) 43, p. 50.

Spray G. H. (1952). The effect of heat on the microbiological and anti-anemic properties of human gastric juice mixed with vitamin B_{12}. Biochem. J. 50, p. 587.

Stohlman Jr F., C. E. Roth en J. C. Rose. (1954). Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. Studies on a patient with polycythemia secondary to regional anoxia. Blood 9, p. 721.

Strauss M. B., R. Brokaw en C. B. Chapman. (1952). Leukemoid bone marrow in pernicious anemia. Amer. J. med. Sci. 223, p. 54.

Sure B. en L. Easterling. (1950). The protective action of vitamin B_{12} against the toxicity of dl-thyroxine. J. Nutr. 42, p. 221.

Swan H. T., E. H. Reisner Jr en M. Silverman. (1955). The effect of various metabolites on the growth of marrow cells in vitro. Blood 10, p. 735.

Swenseid M. E., J. A. Halsted en R. L. Libby. (1953). Excretion of cobalt^{60}-labelled vitamin B_{12} after total gastrectomy. Proc. Soc. exp. Biol. 83, p. 226.

Takacs L. en A. Fekete. (1951). Über die Wirkung von Methylthiouracil auf die erythropoietische Funktion der Schilddrüse. Z. Vit., Horm. Ferm. forsch. 4, p. 237.

Ternberg J. L. en R. E. Eakin. (1949). Erythein and apoerythein and their relation to the anti pernicious anemia principle. J. Amer. chem. Soc. 71, p. 3858.

Thompson R. B. (1952). Observations on the effect of vitamin B_{12}, liver extracts, folic acid and thymine on the maturation of megaloblasts in culture. Blood 7, p. 522.

Tohá J., I. Eskuche, F. Abarca, F. Salvatore en G. Hodgson. (1955). Chemical properties of a plasma factor accelerating haemoglobin recovery in bled rabbits. Nature 175, p. 167.

Ungley C. C. (1950 a). Vitamin B_{12} and other dietary factors in megaloblastic anaemias and in subacute combined degeneration of the cord. Proc. roy. Soc. Med. 43, p. 537.

Ungley C. C. (1950 b). Absorption of vitamin B_{12} in pernicious anaemia. I. Oral administration without a source of intrinsic factor. Brit. med. J. 2, p. 905.

Ungley C. C. (1952). Abstracts annual meeting 1952 of the Brit. Med. Ass and the Irish Med. Ass Brit. med. J. 2, p. 154.

Viault F. (1890). Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des haut plateaux de l'Amérique du Sud. C.R. Acad. Sci. (Paris) 111, p. 917.

Vogelaar J. P. M. en E. Erlichman. (1936). The growth of human fibroblasts in media containing various amounts of thyroxin. Amer. J. Cancer 26, p. 358.

Wallerstein R. O., J. W. Harris, R. F. Schilling en W. B. Castle. (1953). Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anemia. XV. Hematopoietic effects of simultaneous intravenous and of simultaneous or serial oral administration of intrinsic factor and vitamin B_{12}. J. Lab. clin. Med. 41, p. 363.

Welch A. D. en R. W. Heinle. (1951). Hematopoietic agents in macrocytic anemias. Pharmacol. Rev. 3, p. 345.

Welch A. D., V. Scharf, R. W. Heinle en G. C. Meacham. (1952). Assay for intrinsic factor in patients with pernicious anemia in remission given radioactive vitamin B_{12}. Fed. Proc. 11, p. 308.

Welsh I. (1952). Failure of massive doses of vitamin B_{12} in acute leukaemia. Brit. med. J. 2, p. 1133.

West R. (1948). Activity of vitamin B_{12} in Addisonian pernicious anemia. Science 107, p. 398.

Whipple G. H. en F. S. Robscheit-Robbins. (1925). Favourable influence of liver, heart and skeletal muscle in diet on blood regeneration in anaemia. Amer. J. Physiol. 72, p. 408.

Whitby L. (1955). The evolution of the treatment of Addisonian anaemia. Brit. med. J. 1, p. 1401.

Wilkinson J. F. (1949). Megalocytic anaemias. Lancet 1, pp. 249, 241, 336.

Williams Jr. J. N. (1955). Some metabolic interrelationships of folic acid, vitamin B_{12} and ascorbic acid. Amer. J. clin. Nutr. 3, p. 20.

Wilson H. F. en W. R. Pitney. (1955). Serum concentrations of vitamin B_{12} in normal and nutritionally deficient monkeys. J. Lab. clin. Med. 45, p. 590.

Wolf D. E., T. R. Wood, J. Valiant en K. Folkers. (1950). Vitamin B_{12} and the intrinsic factor. Proc. Soc. exp. Biol. 73, p. 15.

Wijmenga H. G., K. W. Thompson, K. G. Stern en D. J. O'Connell. (1954). Preparation and properties of a cobalamin protein. Biochem. biophys. Acta 13, p. 144.

Young C. M. en H. D. Bett. (1944). Bone marrow procedure for assay of liver extracts for anti pernicious anemia activity. J. Pharmacol. 81, p. 248.